Untersuchungen

über

das Myzelwachstum der Phycomyceten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Reinold Schmidt
aus Duderstadt

Mit 29 Textfiguren

Göttingen
1925

Untersuchungen
über
das Myzelwachstum der Phycomyceten

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Reinold Schmidt
aus Duderstadt

Mit 29 Textfiguren

Göttingen
1925

Referent: Prof. Dr. H. Burgeff

Tag der mündl. Prüfung: 25. Februar 1925

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik. Bd. 64. Heft 4.
Gebrüder Borntraeger, Leipzig

Einleitung.

Nach den bisherigen Untersuchungen über die bedingenden Faktoren des Myzelaufbaus erschien es vor allem erforderlich, die Wirkung der Ernährung und der Stoffwechselprodukte gegeneinander abzugrenzen und weiterhin die Frage des Chemotropismus erneut zu bearbeiten. Die Gliederung ergibt sich daraus. In den ersten beiden Kapiteln wird der Einfluß des Mediums auf das Myzelwachstum behandelt; in dem nächsten Abschnitt ist eingehend auf die gegenseitige Einwirkung der Hyphen eingegangen; danach folgen die Untersuchungen über den Chemotropismus. Da bei Vorversuchen mit Anordnungen, die denen der früheren Bearbeiter ähnlich waren, einwandfreie Zukrümmungen beobachtet wurden, war es anfangs das Ziel meiner Untersuchungen, die chemotropischen und wachstumsfördernden Wirkungen von verschiedenen Stoffen zu den physikalisch-chemischen Änderungen in Beziehung zu setzen. Diese Absicht mußte, wie aus dem Kapitel über den Chemotropismus hervorgehen wird, aufgegeben werden. Die Studien über Membranquellung, denen andere über die Permeabilität angeschlossen werden sollten, verdanken diesem ursprünglichen Plan ihre Entstehung.

Als Versuchsobjekte verwandte ich in der Hauptsache Mucorineen, und zwar vor allem: *Phycomyces Blakesleeanus* + Burgeff, *Mucor spinosus* van Tieghem, *Mucor mucedo* + Brefeld, *Mucor hiemalis* + Wehmer, *Mucor Bedrchani* n. sp.

Als Vergleichsobjekt diente ferner häufig *Saprolegnia Thureti* de Bary.

Phycomyces Blakesleeanus Burgeff ist mit dem fälschlich *Phycomyces nitens* Kunze benannten Versuchsobjekt der früheren physiologischen Arbeiten identisch (Burgeff, 1925). Der echte *Phycomyces nitens* (Kunze) van Tieghem wurde nur einmal gelegentlich verwandt.

Abschnitt I.

Hyphenwachstum und Ernährung.

1. Der Einfluß der Nährstoffkonzentration.

Der Einfluß der Nährstoffkonzentration auf den Massenansatz bei Pilzen ist schon oft Gegenstand der Untersuchung gewesen. W. Benecke (1895) prüfte im besonderen bei *Aspergillus*, E. Günther (1897) bei *Rhizopus* die Notwendigkeit der K- und Mg-Salze und den Einfluß verschiedener Konzentrationen durch Bestimmung des Erntegewichts. Pringsheim (1914) fand als Beziehung von Nährstoffmenge zum Myzelgewicht Proportionalität innerhalb gewisser Grenzen. K. O. Müller (1922) untersuchte sodann Hyphendicke, Ausbreitungsgeschwindigkeit und Verzweigungsdichte in ihrer Abhängigkeit von der Ernährung bei *Saprolegnia* quantitativ, nachdem schon vor ihm verschiedentlich qualitativ auf zunehmende Verzweigung bei besserer Ernährung hingewiesen war (Reinhardt, 1892; Miyoshi, 1894; Falk, 1902). Müller stellte ein Optimum der Nährstoffkonzentration für die Ausbreitungsgeschwindigkeit fest und zeigte, daß mit steigender Ernährung auch die Werte für Hyphendurchmesser und Verzweigung ansteigen. *Saprolegnia* scheint dabei am auffallendsten mit Änderung der Verzweigung auf Wechsel der Nährstoffzufuhr zu reagieren.

Da *Phycomyces Blakesleeanus* bei gelegentlicher Beobachtung sich hinsichtlich der Verzweigung weniger deutlich verhielt und vor allem auch das Zahlenverhältnis von Lang- zu Kurzhyphen — d. h. von den weiter auswachsenden Seitenhyphen zu denen, die kurz nach der Anlage das Wachstum einstellen — nicht konstant zu sein scheint, wie Müller das für *Saprolegnia* annimmt, war es erforderlich, die Verhältnisse hier genauer zu untersuchen.

Da das Verhältnis von Lang- zu Kurzhyphen nur bei nicht sehr dichten Myzelien feststellbar ist, verwandte ich niedere Nährstoffkonzentrationen. Die Nährböden wurden in gleicher Weise vorbereitet. Zu 50 ccm eines 2proz. Agarsols kamen 50 ccm einer

entsprechenden Nährlösung. Die Konzentrationen unter 1% sind durch Verdünnung hergestellt, höhere einzeln abgewogen. Sterilisiert ist im Autoklaven ohne Druck je 45 Min. an 2 aufeinanderfolgenden Tagen. Der Agar (ein besonders reines japanisches Präparat) gab schon bei 1% eine Gallerte gewünschter Konsistenz. Von diesen Böden wurden je 15 ccm in Petrischalen auspipettiert. Die Kulturen standen in dunklen Thermostaten. Um individuelle Schwankungen zu vermeiden, stellte ich von einem Sporangium eine Sporenaufschwemmung in sterilem Wasser her und gab sie auf einen Boden von 1% Malzagar. Es wurde dann je ein Keimmyzel mit dem Platinspatel in die Schalen übertragen.

In einer ersten Versuchsserie kam Pepton „Witte“ (Kahlbaum) mit 0,01% $MgSO_4$ und 0,01% KH_2PO_4 als Nährstoff zur Verwendung. Es traten aber schon bei geringen Konzentrationen Schädigungen auf. Wie der Geruch älterer Kulturen zeigt, findet eine Anreicherung von NH_3 bei höheren Konzentrationen statt. Offenbar wird die Kohlenstoffkomponente in stärkerem Maße verbraucht. So betrug z. B. der radiale Zuwachs der Myzelien für das Intervall von 48—72, bezw. von 72—84 Stunden nach der Impfung bei 20°C:

Tabelle 1.

Pepton-Konzentration	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5 %
Dr. I	5	8,5	6	5,5	5 mm
Dr. II	5	7,5	5,5	4	4 mm

Die Messungen stammen in jedem Fall wie bei allen übrigen Versuchen aus zwei Kulturen. Der Radius wurde durch Messung zweier aufeinander senkrecht stehender Durchmesser mit dem Millimetermaß bestimmt.

Da sich Malzagar auch gegenüber einigen anderen Versuchen mit Kohlehydrat-Nährsalzböden als überlegen erwies, wurden trotz seiner komplizierten und nur ungenau bekannten chemischen Zusammensetzung die weiteren Versuche mit ihm angestellt. Verwandt wurde das Präparat „Malthyl“ der Firma Gehe u. Co., Dresden („Analyse“ S. 535). Um die Messungen möglichst objektiv zu machen, wurde folgendermaßen verfahren: Wenn der Durchmesser des Myzels 4 cm überstieg, wurde der Umfang auf der Schalenunterseite mit fünf gleich weit voneinander entfernten Marken versehen und von diesen je rechts und links die zwei nächsten

Hyphen gemessen, die durch das ganze Gesichtsfeld des Mikroskops hindurch verfolgbar waren.

Diese Hyphen wurden so ins Gesichtsfeld eingestellt, daß sie mitten hindurchgingen und ihre jüngste Abzweigung noch gerade am Rande sichtbar war. Der Hyphendurchmesser wurde dann mit Okularmikrometer und Ok. 4 Obj. 3 Leitz in der Mitte des Gesichtsfeldes gemessen und gleichzeitig die Zahl der Seitenhyphen gezählt, deren Abzweigstellen auf der Strecke Bildrand zu Bildrand — 1,4 mm — zu sehen waren. Um das Zahlenverhältnis von Lang- zu Kurzhyphen zu bestimmen, wurde jede zweite Haupthyphe um eine Gesichtsfeldbreite zur Myzelmitte hin verschoben und der Abstand der Langhyphen gemessen. Da zwischen Kurz- und Langhyphen Übergänge vorhanden sind, wurde eine Grenze festgesetzt. Der Durchmesser des Gesichtsfeldes 1,4 mm erwies sich dafür geeignet. Es wurden so an 20 Hyphen der Durchmesser, auf einer Strecke von insgesamt 28 mm die Zahl der Seitenhyphen und auf einer von 14 mm der Abstand der Langhyphen bestimmt.

Das Resultat ist aus Tabelle 2 zu ersehen. Dr. ist der Zuwachs in 48—72 Stunden, HD. der Hyphendurchmesser in Mikrometerskalenteilen, HD. max. der größte der gemessenen Durchmesser, SZ. der durchschnittliche Abstand der Abzweigstellen zweier Seitenhyphen in μ, LZ. der zweier Langhyphen. Die vorletzte Reihe gibt an, auf wieviel Seitenhyphen eine Langhyphe kommt. In der letzten Reihe ist die Verzweigungszahl für 24 Stunden angegeben. Temperatur: 20—21° C. Versuchsobjekt ist *Phycomyces Blakesleeanus*. Die Messung des Langhyphenabstandes wird bei höheren Konzentrationen unmöglich, die der Seitenhyphen ungenau. Der Abstand von zwei Seitenhyphen wird in Wahrheit noch niedriger sein, als die Tabelle angibt, da Verdeckungen bei dichtem Myzel häufig sind.

Tabelle 2.

Malzagar-Konzentration	0,005	0,01	0,1	0,5	1,0	3,0	5,0 %	10,0 %	
Dr.	5	6,2	7,5	9,5	10,7	12,5	14	17	mm
HD.	$\langle$ 1	1,05	1,16	1,26	1,43	1,73	2,00	2,58	
HD. max. . .	1,1	1,2	1,6	1,7	1,9	2,2	2,3	3,1	
SZ.	185,9	174,4	146,3	114,3	94,4	96,8	91,6	69,6	μ
LZ. . . .	622,5	571,6	425,8	351,7	242,5	—	—	—	μ
SZ. : LZ. . .	3,4	3,3	2,9	2,9	2,6	—	—	—	
SZ. f. 24 St. .	26,9	35,6	51,3	83,1	113,3	129,1	152,8	244,2	

Auf bessere Ernährung reagiert *Phycomyces Blakesleeanus* und, wie in anderen Versuchen zu sehen war, auch *Mucor spinosus* mit Heraufsetzen der Wachstumsgeschwindigkeit, Vergrößerung des Hyphenquerschnitts und stärkerer Verzweigung. Messungen bei *Phycomyces Blakesleeanus* zeigen, daß das Auswachsen von Seitenhyphen zu Langhyphen dabei stärker zunimmt, als die Anlage von Verzweigungen überhaupt. Das Verhältnis von Seiten- zu Langhyphen ist inkonstant und wird mit zunehmender Ernährung kleiner.

Ein Optimum der Nährstoffkonzentration für die Ausbreitungsgeschwindigkeit zeigt erst der folgende Versuch mit noch höheren Konzentrationen.

Tabelle 3.

Malz-Konzentration	10	15	20	25 %
Dr.	9	9,5	8,5	8 mm

Die absoluten Werte selbst sind wegen anderer Bedingungen mit denen der vorhergehenden Tabelle nicht vergleichbar. Das Optimum liegt demnach bei etwa 10%.

Bei niederen Konzentrationen, bei denen das Wachstum so langsam erfolgt, daß der umgebende, noch unbewachsene Agar durch Abdiffusion zum Myzel wesentlich nährstoffärmer wird, muß sich die Verzweigung, Hyphendicke usw. im Lauf der Myzelentwicklung merklich ändern. Bei den Konzentrationen 0,015—0,1 % Malz wurden einige Hyphen messend bis an den Rand verfolgt. Abnahme des Hyphendurchmessers ergab sich sicher; ein Sinken der Verzweigung schien vorhanden zu sein, kann aber nicht als gesichert gelten. Auf 0,002 % Malz wächst *Phycomyces Blakesleeanus* nicht mehr aus. Bei 0,005—0,01 war nach 84 Stunden das Myzel noch nicht kreisförmig geschlossen. Die Hyphen wuchsen zwar zentrifugal, waren aber nicht streng radiär gestellt und in großen Abständen voneinander. *Phycomyces Blakesleeanus* ist da anspruchsvoller als *Mucor spinosus*, der auf reinem Regenwasseragar die Petrischale mit radiär gestellten, mikroskopisch dünnen Hyphen durchwächst. Auch *Penicillium* vermag dem Agar noch genügend Nährstoffe zu entziehen. Gewöhnlicher Agar wirkt also noch ernährend, was sich bei niederen Konzentrationen bemerkbar machen wird.

2. Der Einfluß der Schichtdicke.

Über den Einfluß der Schichtdicke sagt Müller, daß sie nicht von Einfluß sei auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Nähere Angaben, im besondern ob er die Schichtdicke mit gleichbleibender Konzentration und wechselnder absoluter Nährstoffmenge oder umgekehrt untersuchte, fehlen. Da es für spätere Versuche wünschenswert erschien, hier sichere Unterlagen zu haben, wurde die Frage, ob absolute Nährstoffmenge oder Konzentration für die Ausbreitungsgeschwindigkeit usw. maßgebend sei, untersucht. Die Unterschiede waren hier nicht so groß zu erwarten, weil der Nährboden der Beobachtung halber eine gewisse Dicke nicht übersteigen konnte. Es wurde darum versucht, die Meßmethode noch objektiver zu gestalten (Fig. 1). Der Myzelumfang der Kulturen wurde zu gleicher Zeit mit Glasstift umrandet, und dieser Kreis (gebrochene Linie) in zehn gleichen Abständen mit Marken versehen. Die Schalen wurden dann zur Messung so auf den Mikroskoptisch gestellt, daß eine solche Marke *(a)* mit einer an der Tischöffnung (ausgezogene Linie) befindlichen *(b)* sich deckte.

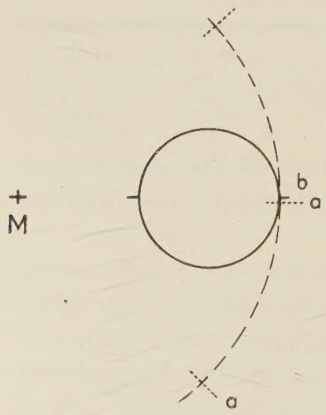

Fig. 1.

Lagen Myzelmitte *(M)*, Mitte der Tischöffnung und Marken in einer Linie, so wurde in dem so eingestellten Gesichtsfeld mit Okular 4 Objektiv 3 Leitz gemessen und zwar

1. der Durchmesser der vier stärksten Hyphen, so daß also 40 Hyphen gemessen wurden;

2. bei zwei gerade gewachsenen Hyphen, wenn möglich, bei den zwei stärksten, die Zahl der Seiten- und Langhyphen, so daß diese also an 20 Hyphen bestimmt wurde;

3. die Dichte, d. h. es wurde die Zahl der Hyphen gezählt, die durch das Gesichtsfeld ganz hindurchgingen (ein- und austraten).

Tabelle 4 gibt die Durschschnittswerte für *Phycomyces Blakesleeanus* an. In Stab 1 ist die Substratmenge in ccm angegeben, in Reihe 1 die Malzkonzentration. 40 ccm entspricht einer Substrathöhe von ca. 6 mm.

Tabelle 4.

Absolute Nährstoffmenge.

Substratmenge	0,15	0,3	0,6	% Malz
10 cm³	15	30	60	} mgr Malz
20 „	30	60	120	
40 „	60	120	240	
	Hyphendurchmesser in Skalenteilen.			
10 cm³	1,09	1,32	1,41	
20 „	1,37	1,39	1,53	
40 „	1,51	1,53	c. 1,6	
	Täglicher Zuwachs in Millimetern.			
10 cm³	8,9	9,0	9,4	
20 „	9,5	9,3	9,8	
40 „	9,3	9,5	11,4	
	Seitenhyphenzahl im Gesichtsfeld.			
10 cm³	13,1	14,4	16,1	
20 „	13,4	17,2	17,1	
40 „	15,6	17,7	—	
	Langhyphenzahl im Gesichtsfeld.			
10 cm³	3,1	3,8	5,2	
20 „	4,1	4,5	6,3	
40 „	c. 6	> 5	—	
	Dichte.			
10 cm³	6,8	12,2	15,1	
20 „	10,2	15,0	17,8	
40 „	13,3	18,2	>> 20	

Bei 40 cm³ wird die Bestimmung der Langhyphenzahl ungenau. Wie ein Querschnitt des Agars ergibt, wächst das Myzel im oberen Teil des Substrats und entsendet Hyphen, auch Langhyphen, in größerer Zahl schräg nach unten, die der Beobachtung bei der ohnedies erschwerten Durchsicht durch die hohe Agarschicht zum Teil entgehen. Die Verzweigungszahl für 40 cm³ wird daher zu niedrig sein.

Um diese Größen zueinander in Beziehung zu bringen, wurde das relative Erntegewicht berechnet. Müller gibt als Formel für Flüssigkeitskulturen r^3h^2z an (r = Radius, r^3 wegen der Kugelgestalt, h^2 = Hyphenquerschnitt, proportional dem Quadrat des Durchmessers; z = Zahl der Tochterhyphen für eine bestimmte Strecke).

Ich setze hier r^2h^2D, weil z bei 40 cm^3 ungenau wird, und wobei unter D die Dichte zu verstehen ist, r^2, weil das Myzel hier als zweidimensional angenommen werden kann. Die Verwendung von D gleicht die Ungenauigkeit, die durch die verschiedene Tiefenausdehnung des Myzels hereinkommt, etwas aus. Gegen Verwendung von z ist auch einzuwenden, daß die Vorbedingung (Konstanz des Zahlenverhältnisses von Lang- zu Seitenhyphen) nicht erfüllt ist.

Tabelle 5a.

Substratmenge	r^2h^2D		
	0,15	0,3	0,6
10 cm^3	14,6	48,8	77,3
20 „	49,0	61,3	102,3
40 „	75,1	104,2	(165)

Auf die gleiche absolute Nährstoffmenge — 30 mg = 1 — bezogen ergeben sich die relativen Erntegewichte.

Tabelle 5b.

Substratmenge	r^2h^2D		
	0,15	0,3	0,6
10 cm^3	0,60	1,00	0,79
20 „	1,00	0,62	0,52
40 „	0,76	0,53	—

Aus den Zahlen ergibt sich, daß für die Ausgestaltung des Myzels nicht die Konzentration, sondern die absolute Nährstoffmenge maßgebend ist. Die letzte Tabelle, die die Erntegewichte bezogen auf 0,030 g Malz angibt, entspricht nicht dem Satz Pringsheims (1914): „Bei ein und derselben Nährlösung entspricht die Pilzernte dem Volumen der Flüssigkeit, bei gleichem Volumen angenähert der Nährstoffmenge“. Es ist dabei zu beachten, daß es bei größeren Nährstoffmengen nicht zur vollen Ausnützung des Bodens kam; denn die Myzelien wurden vor der Fruktifikation gemessen. Pringsheims Satz gilt aber nur dann, wenn die Nährstoffe verbraucht sind. Der Wert 0,60 bei geringster Nährstoffmenge fällt in der Tabelle als zu niedrig auf. Es erscheint gut denkbar, daß ein Stoff hier in so geringer Menge da war, daß er begrenzend wirkte. Das Myzel war auch nicht „geschlossen“.

Der Wechsel der Schichtdicke ist also nur dann ohne Einfluß auf Ausbreitungsgeschwindigkeit, Hyphendurchmesser und Dichte, wenn die absolute Nährstoffmenge gleichbleibt. Das gilt natürlich bei Nährböden gallertiger Natur nur innerhalb gewisser Grenzen. Schon bei 0,6% Malz und 40 cm^3 vermag *Phycomyces* den Nährboden in seiner Tiefenausdehnung (ca. 6 mm) nicht mehr ganz zu durchwachsen. Bei besserer Ernährung geht er immer mehr an die Oberfläche und entsendet nach unten fast senkrecht abgehende „Saug"-Hyphen, die bei höheren Schichten den Boden bei weitem nicht mehr erreichen. Von dort kommen die Stoffe erst durch Diffusion, die besonders bei Kolloiden im Agar ziemlich langsam vor sich geht, in den Bereich des Pilzes. Je länger nun dieser Diffusionsweg ist, um so größer sind natürlich die Abweichungen, die sich im besonderen für Ausbreitungsgeschwindigkeit und Verzweigung ergeben werden. Wenn insbesondere die Mucorineen, bevor der Boden von ihnen ausgenutzt ist, anfangen, zu fruktifizieren, ist die gleiche Abhängigkeit der gemessenen Größen von der Nährstoffmenge und auch die Gültigkeit der Formel für das relative Erntegewicht nicht mehr zu erwarten.

3. Das Wachstum auf großer Substrathöhe.

Es erschien interessant, den Fall zu verwirklichen, in dem ein Myzel auf so hoher Schichtdicke wächst, daß dauernd von unten her neue Nährstoffmengen eindiffundieren. Da die Diffusion in wässeriger Lösung rascher vor sich geht, als in Gallerte, wurde Malzlösung verwandt. Um Kugelform des Myzels zu verhindern und eine flächenhafte Ausdehnung des Myzels herbeizuführen, wurde der Versuch folgendermaßen angeordnet: Ein ca. 1 cm breiter und 2 mm dicker Korkrahmen mit einer viereckigen Öffnung von 3 : 3 cm wurde mit einer Zelloidinmembran überspannt und darauf mit dem Platinspatel ein Keimmyzel übertragen, das mit einer zweiten Zelloidinmembran überdeckt wurde. Dann wurde ein zweiter gleicher Korkrahmen aufgelegt und mit dem ersten durch eingestoßene und abgebrochene Glasspitzen zusammengeheftet. Zur Sterilisation wurde die Zelloidinmembran (betr. Herstellung vgl. Burgeff, 1924) zuerst in ein Gefäß mit verdünntem H_2O_2 gegeben und dann zum Aus-

Fig. 2.

waschen in steriles Wasser übertragen. Die Myzelien blieben in beiden Lösungen ungefähr je 24 Stunden.

Fig. 2 gibt die Anordnung im Querschnitt an (Fig. 2).

Auf 200 bezw. 300 cm^3 Malzlösung verschiedener Konzentration (0,1—3 % Malz) wurde alsdann dieser schwimmende Rahmen aufgesetzt. Bei dieser Anordnung konnten einerseits die Nährstoffe leicht von unten her eindiffundieren, andererseits Stoffwechselprodukte jeder Art leicht abdiffundieren (die Zelloidinmembran ist auch für Kolloide wie z. B. Kongorot leicht durchlässig). Es wird also sowohl ein negativer Chemotropismus auf die eigenen Stoffwechselprodukte (Müller, 1922) als auch ein allenfalls vorhandener positiver auf Nährstoffe im Myzel so stark herabgesetzt werden, daß es fraglich erscheint, ob hier eine radiäre Einstellung durch chemotropische Einkrümmung überhaupt möglich sein wird. Das Myzel wächst bei der verhältnismäßig hohen Nährstoffmenge so üppig, daß die dehnbaren Membranen in der Mitte voneinander abgehoben werden. Es hat im Querschnitt bikonvexe Gestalt. Weil besonders stark an der Basis Wachstum erfolgt, werden die älteren Hyphenteile hochgehoben und kommen so in ungünstigere Bedingungen. Eine gleichmäßige Zudiffusion von Nährstoffen und Abdiffusion von Stoffwechselprodukten ist darum nicht ganz erreichbar. Es unterbleibt nun tatsächlich die scharfe radiäre Einkrümmung der Tochterhyphen, wie sie bei geringen Schichtdicken normal ist. Trotzdem kommt ein kreisförmiges Myzel mit einem typischen Rand radiär gestalteter Hyphen zustande. Die nähere Analyse ergibt: die Tochterhyphen erster Ordnung biegen nur allmählich nach außen, verlaufen also in schwachem Bogen zwischen den Nachbarhyphen hindurch und bekommen so erst nach längerer Zeit radiäre Einstellung. Ihr Weg bis zum Rand ist aber so viel weiter, als der der Mutterhyphen, daß sie diese nicht einholen und an der Bildung des äußeren Randes nicht beteiligt sind. Sie führen vielmehr eine enge Verflechtung der Hyphen und die dicke, polsterförmige Ausbildung des zentralen Teiles herbei. Die sekundären Randhyphen dagegen sind im wesentlichen Tochterhyphen zweiter und höherer Ordnung, und zwar sind es vor allem die ersten zentrifugalen Verzweigungen der Seitenhyphen erster Ordnung, die von

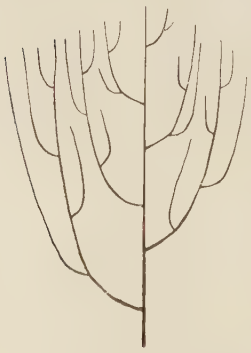

Fig. 3.

vornherein ziemlich radiäre Einstellung besitzen. Die Abzweigwinkel sind gleich und als Gegenwinkel an geschnittenen Parallelen aufzufassen. Fig. 3 zeigt das Zustandekommen der radiären Einstellung in einer Agarschicht von 10 cm³ 1 % Malz in einer Petrischale, Fig. 4 dasselbe für einen solchen Schwimmerversuch auf 200 cm³ 1 % Malz schematisiert.

Dieser Versuch ist indirekt ein Beweis dafür, daß die radiäre Einstellung auf dünnem Nährboden durch Chemotropismus bedingt ist. Dieser Fall anderer radiärer Einstellung der Randhyphen ist auch anscheinend bei kugelförmigen Myzelien von *Phycomyces* in Flüssigkeitskultur verwirklicht. Interessant ist, daß das Zahlenverhältnis von Lang- zu Kurzhyphen ganz erheblich zugunsten der

Fig. 4.

ersteren verschoben ist. In den peripheren, noch dünnen Teilen erscheint diese Differenzierung fast ganz aufgehoben. Fast alle Hyphen wachsen aus.

Abschnitt II.

Hyphenwachstum und Sauerstoffversorgung.

1. Die Hyphenanordnung im Substratquerschnitt.

Auffallend ist beim Wachstum in steigenden Konzentrationen die verschiedene Anordnung der Hyphen im Agarboden. Durchwächst der Pilz auf niederer Konzentration noch gleichmäßig das Substrat, so beginnt er bei 1 % Malz in der Oberfläche zu wachsen,

um dann bei hohen Konzentration, z. B. 15% Malz, dicke, leicht abhebbare Myzelhäute auf der Oberfläche zu bilden. Falk (1902) beschreibt für *Sporodinia* diese Substrathaut, die auf günstigem Boden gebildet wird. Er sieht sie teleologisch als Reservestoffspeicher, Schutz gegen Auswaschung und als Verankerung und Anlagepunkt für die fertilen Hyphen an. K. O. Müller (1922) sagt für *Saprolegnia*, daß neben den Fäden im Agar noch andere an der Oberfläche entlang wüchsen und zwar in um so reicherem Maße, je besser die Ernährung sei. Er faßt diese Hyphen anscheinend als Übergang zum Luftmyzel auf, das nach ihm dann bei sehr reichlicher Ernährung und hoher Luftfeuchtigkeit entsteht.

Zur Erklärung dieser verschiedenen Verteilung kommen hier nur zwei Faktoren in Frage. Die Hyphen könnten sich dem Grade ihrer Ernährung entsprechend erstens gegenüber der Luftfeuchtigkeit und zweitens gegenüber der O_2-Versorgung verschieden verhalten. Um diese Frage zu klären, wurde zuerst eine Versuchsreihe mit wechselnder Luftfeuchtigkeit angesetzt. Da die Konzentration, bei der *Phycomyces* anfängt an die Oberfläche zu wachsen, zwischen 1 und 2% Malz liegt, wurden von den Konzentrationen 0,5—1—2—3% Malz (1,5% Agar) je sechs Schalen mit einem Keimmyzel beimpft. Die Petrischalen wurden mit dem Deckel nach unten in den Thermostaten gestellt, und dabei in je zwei Schalen ein Filtrierpapier mit sterilem destilliertem Wasser, in je zwei ein Uhrglas mit $CaCl_2$ gegeben, während zwei zur Kontrolle unverändert blieben. Die Hyphenverteilung konnte dadurch in keiner Weise beeinflußt werden. Dieses Resultat war eigentlich von vornherein nicht anders zu erwarten. Nach Eschenhagen steht der osmotische Wert der Hyphen in Abhängigkeit von der Konzentration des Mediums. Bei niederer Konzentration ist dieser osmotische Wert der Hyphen also auch entsprechend gering, und es ist klar, daß wenn man eine Hyphe mit hohem und eine mit geringem osmotischem Wert in einen Luftraum mit noch niedrigerer relativer Dampfspannung bringt, die letztere der beiden Hyphen allerdings eher durch übergroße Wasserabgabe zugrunde gehen und austrocknen muß als die erstere. Da die Agargallerte nun aber als eine übersättigte Lösung von Wasser in Agar aufzufassen ist, der Quellkörper also erheblich über sein Quellungsmaximum hinaus Wasser enthält (Walter, 1923), käme in unserem Fall ein Austrocknen oberflächlicher Hyphen auch bei geringem osmotischem Wert gar nicht in Frage. Auch in dem Versuch mit $CaCl_2$ können

die Hyphen auf der Oberfläche das Wasser, das ihnen entrissen wird, sofort wieder aus dem Agar entnehmen. Das ändert sich erst, wenn der Agarboden eine so große Menge Wasser abgegeben hat, daß sein Quellungsdruck von Bedeutung wird. Es steigt bei oberflächlich wachsenden Hyphen mit abnehmender Luftfeuchtigkeit nur der Wasserdurchgang. Es ist also von vornherein ganz unwahrscheinlich, daß auf die Hyphenverteilung beim Wachstum auf verschiedenen Konzentrationen die Luftfeuchtigkeit oder besser gesagt, das Verhältnis der relativen Dampfspannung der Hyphen zu der des Luftraums eine Rolle spielt. Bei einer Petrischale mit Agarboden ist normal noch Kondenswasser am Deckel, d. h. es grenzt destilliertes Wasser mit der relativen Dampfspannung 1 an den Luftraum an.

Die Auffassung, daß der O_2-Bedarf für die Verteilung maßgebend sei, läßt sich durch folgende Beobachtung stützen: Myzelien von *Phycomyces Blakesleeanus* wurden auf 40 cm^3 0,15—0,3—0,6 % Malz in Petrischalen gezogen. Die Schichtdicke betrug ca. 6 mm. Alsdann wurden radiale schmale Streifen aus dem Agar ausgeschnitten und nach Umlegen von der Seite her die Tiefenverteilung der Hyphen im Substrat untersucht.

Bei 0,15 % Malz durchzogen die Hyphen ganz gleichmäßig den Agar.

Bei 0,3 % Malz wurde die obere Hälfte bereits bevorzugt. Ein Aufkrümmen von Hyphen, die im unteren Teil wuchsen, war nicht selten. Hyphen kamen aber noch am Boden häufig vor.

Bei 0,6 % Malz ist der überwiegende Teil der Hyphen etwas von der Oberfläche entfernt im oberen Drittel angeordnet. Von hier aus wachsen Seitenhyphen schräg nach vorn gerichtet ins Substrat hinein und lösen sich in ganz dünne Hyphen auf. Der Boden wird dabei nicht mehr ganz erreicht. Bei höheren Konzentrationen wird das Hyphenmaximum noch mehr zur Oberfläche bis auf die Oberfläche verschoben, und die unteren Zonen werden nicht mehr bewachsen. Die mit zunehmender Ernährung steigende Bevorzugung der oberen Substratschichten und als Fortsetzung davon das Übergehen auf die Oberfläche sind auf steigenden O_2-Verbrauch zurückzuführen. Bei geringem Stoffumsatz, z. B. auf 0,15 % Malz, kann der O_2-Bedarf völlig durch die im Substrat gelöste Menge gedeckt werden, bei üppigem Wachstum nicht mehr[1]).

1) Es sei dabei an die geringe Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs im Wasser erinnert. Das Verhältnis der Diffusionsgeschwindigkeit von CO_2 zu O_2 ist nach Exner (1895) 54,8 zu 2,3.

Andere Pilze verhalten sich im Prinzip wie *Phycomyces Blakesleeanus*, reagieren aber bei den einzelnen Nährstoffmengen verschieden. So wachsen z. B. *Mucor spinosus* und *Mucor mucedo* bei Malzkonzentrationen schon auf dem Substrat, bei denen *Phycomyces Blakesleeanus* noch ziemlich gleichmäßige Verteilung zeigt.

2. Der Aërotropismus.

Die häufigen Aufkrümmungen der Hyphen, die bei höheren Konzentrationen noch submers wachsen, müssen nach den vorhergehenden Ergebnissen aërotropischer Natur sein.

Fig. 5.

Positiven Aërotropismus hat La Garde (1911) für Keimschläuche der Mucorineen nachgewiesen. Er verteilte Sporen in einem Tropfen Nährlösung auf dem Objektträger. Das darauf gelegte Deckglas wurde bis auf einige Stellen mit Paraffin umrandet. In anderen Versuchen wurden Luftblasen eingeschlossen und die Deckgläser ganz umrandet. Er fand bei *Phycomyces*, *Rhizopus*, *Mucor spinosus* und anderen *Mucor*-Arten zwei Formen der Reaktion: 1. den Aërotropismus, bei dem die Keimschläuche direkt auf die O_2-Quelle zuwachsen, 2. die Aëromorphose, bei der die Hyphen auf der der Luft zugewandten Seite sich reicher verzweigen und durch Förderung dieser Tochterhyphen die Luft erreichen.

Da von einer Neigung zu tropistischen Krümmungen bei Keimschläuchen nicht ohne weiteres auf eine solche bei Myzelhyphen geschlossen werden kann (Umstimmungsmöglichkeiten vgl. Müller, 1922), wurde für diese das Vorhandensein des Aërotropismus mit einer anderen Methode geprüft. Eine Zelloidinmembran von 4 : 8 cm wurde auf den Rand eines Myzels aufgelegt, das mit Impfstrich in eine Drigalskischale (3% Malzagar) geimpft war. Auf die Zelloidinmembran wurde eine Glimmerplatte aufgelegt, die ungefähr 2 cm breit und 8 cm lang und in der Mitte mit einer Längsreihe von Löchern versehen war. Die Löcher wurden in Abständen von 0,5 bezw. 1,0 cm eingestochen. Die Membran sollte ein Durchwachsen der Hyphen durch die Löcher verhindern. Die Glimmerplatte wurde so angeordnet, daß der Abstand der Löcher vom Myzelrand 1 bis 3 mm betrug. Kurz nach Auflegen der Platte stellen alsdann die Hyphen ihr Wachstum ein; nur so viele wachsen weiter, als der O_2-Gehalt des Bodens gestattet. Es gelingt dem Pilz auch bei nicht perforierter Platte (3 cm Breite) durch Ausnutzung des im Agar gelösten Sauerstoffs mit einigen Hyphen den gegenüberliegenden Rand zu erreichen. Die übrigen Hyphen sterben bald ab. Ihr Plasma ballt sich zusammen, löst sich von der Wand ab und zerfällt. Bei perforierter Glimmerplatte wachsen Hyphen vor allem in der Nähe der Löcher aus und zwar in desto reicherem Maße, je näher die Löcher dem Myzelrand liegen. Diese Hyphen behalten anfänglich ihre alte Richtung bei, um dann die Löcher durch tropistische Krümmung oder durch einseitige Förderung entsprechender Seitenhyphen zu erreichen. Neben echtem Aërotropismus, d. h. einer Zukrümmung der Hyphe selbst (Fig. 5), tritt vor allem die Reaktionsform auf, die la Garde als Aëromorphose bezeichnet und die dadurch, daß die Hauptachsen stark im Wachstum gegenüber den geförderten Seitenachsen zurückbleiben, einen echten Aërotropismus vortäuschen kann (Fig. 6).

Fig. 6.

Da dem Ausdruck Aëromorphose entsprechend später bei Reaktionen auf chemische Diffusionszentren der Ausdruck Chemomorphose verwandt werden müßte, man darunter aber eine qualitative Gestaltsveränderung versteht, erscheint die Wahl einer anderen Bezeichnung nötig. Ich schlage statt Morphose die Bezeichnung „Anisotrophie" vor und verstehe darunter die einseitige Wachstumsförderung von entsprechend gerichteten Organen, insbesondere von Seitenorganen, auf eine Stoffquelle hin. Durch „Aëro-Anisotrophie" reagiert der Pilz auf ein O_2-Diffusionszentrum viel häufiger als durch Aërotropismus. Die Hyphen erreichen so die Löcher in der Glimmerplatte, die nun zu einem Myzelmittelpunkt werden. Von jeder Durchbohrung aus wachsen dünne Hyphen radiär so weit in den Agar hinein, wie die O_2-Versorgung dies zuläßt. Unter dem Loch selbst wird das Hyphengeflecht sehr dicht[1]).

Abschnitt III.

Gegenseitige Wachstumshemmung.

Bei allen Fragen nach dem Zustandekommen des Myzelaufbaues steht das Problem der hypothetischen „spezifischen" Stoffwechselprodukte im Mittelpunkt. Ihre wachstumsfördernden (Küster, 1908, Lutz, 1909, Reese, 1911, Müller, 1922), wachstumshemmenden (Küster, Lutz, Müller) und ablenkenden (Fulton, 1906, Clark, 1902, Graves, 1916, Müller) Wirkungen sind von Küster und Müller als wesentlichstes Erklärungsprinzip verwandt. Beim Aufeinandertreffen zweier Myzelien soll das Einstellen des Wachstums im Hemmungsraum auf Grund der wachstumhemmenden Eigenschaften der Stoffwechselprodukte erfolgen. Das Aufholen der Tochterhyphen und die Einregulation am Myzelrand wird dagegen durch die wachstumfördernde Wirkung der Stoffwechselprodukte, die an der Stelle der stärksten Konzentration am größten sein soll, erklärt. Es geht aus der Literatur über die Stoffwechselprodukte bei Pilzen hervor, daß sicher ganz verschieden bedingte Erscheinungen mit der gleichen Hilfsannahme von rätselhaften Stoffwechselprodukten erklärt sind, oft auch dann, wenn andere einfache Erklärungsmöglichkeiten genügt hätten.

1) Für *Phycomyces* beschreibt la Garde Gemmenbildung. Der Abbildung nach hat er die Reservestoffblasen, die *Phycomyces* normal bildet, verkannt.

Wie sehr es unmöglich ist, auf diesem Gebiet zu verallgemeinern, zeigen die Literaturangaben über Hemmungsräume. Reinhardt (1892) findet z. B., daß sich *Peziza*-Myzelien gleicher Art ohne weiteres durchwachsen, solche verschiedener Art aber nicht. Er glaubt an Enzymausscheidungen. Eigenes Enzym hemmt nicht, fremdes führt wenigstens anfangs zu Wachstumseinstellung.

Boas (1919) sagt über solche Hemmung bei *Oidium lactis*: „Diese Erscheinungen kommen bei Kulturen gleicher Art sehr häufig vor und sind vielleicht geeignet einen Hinweis auf verwandtschaftliche Beziehung zu geben; jedenfalls durchwachsen sich Kulturen verschiedener Art ohne weiteres, wie die tägliche Erfahrung im Laboratorium lehrt.“ Liesegang (1924) führt diese Erscheinung von Boas — auf Grund von Modellversuchen — auf Diffusion von Nährstoffen in der Gallerte zu den verbrauchenden Myzelien zurück. Verschiedene Arten sollen deshalb keine Lücken ausbilden, weil sie verschiedene Nährstoffansprüche stellen. Müller (1922) glaubt für den Hemmungsraum bei *Saprolegnia* Nahrungsmangel als Ursache ablehnen zu können. Er nimmt „ganz bestimmte Stoffe“ als wirksam an, die als Stoffwechselprodukte vom gegenüberliegenden Myzel ausgeschieden werden. Als Stütze führt er an, daß mit steigender Konzentration die Breite der Hemmungsgasse zunimmt (Pepton als einzige C- und N-Quelle).

1. Der Hemmungsraum bei verschiedenen Phycomyceten.

Da es ganz unmöglich ist, sich aus der Literatur ein Bild über Hemmungsräume und hemmende Ursachen zu machen, wurden die Verhältnisse bei den Phycomyceten eingehend untersucht. Zuerst seien die Ereignisse beim Aufeinandertreffen zweier Myzelien der gleichen Art beschrieben.

Kommen die Hyphen in eine gewisse Nähe des anderen Myzels, so sinkt ihre Wachstumsgeschwindigkeit plötzlich sehr stark, um dann allmählich zum Stillstand zu kommen. Bei kreisförmig sich ausdehnenden Myzelien wird diese Nähe natürlich zuerst von den Hyphen an der Verbindungslinie der beiden Impfstellen — in der späteren Mitte des Hemmungsraums — erreicht. Je stärker die Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit ist, um so mehr haben die beiden Flanken Zeit aufzuholen, um so auffallender ist die Abplattung der beiden Myzelien gegeneinander; bei geringer Herabsetzung behalten sie bis zur Berührung fast die Kreisform. Die

aufholenden Hyphen beiderseits der Mitte kommen dann gleichfalls in die Nähe des anderen Myzels und erfahren nach außen fortschreitend die Wachstumsverzögerung. Der Abstand vom anderen Myzel, bei dem die Hemmung eintritt, nimmt dabei nach außen mit kleiner werdendem Winkel des Zusammentreffens der Hyphen ab. Chemotropische Ablenkungen sind hier typisch. Bei kleinen Winkeln des Aufeinanderstoßens kommen Überschneidungen und Einkrümmungen der abbiegenden Hyphen ins andere Mycel häufig vor. Der Hemmungsraum hat im typischen Fall die Gestalt einer Spindel, die auf der Verbindungslinie der Myzelmitten senkrecht steht.

Dieser primäre Hemmungsraum bleibt nicht unverändert. Nach einiger Zeit werden die Hyphenspitzen entleert und durch eine Wand abgegliedert. Sie sind alsdann sehr dünn und nur bei stärkerer Vergrößerung sichtbar. Dicht hinter der Querwand entstehen dann Anlagen von Sporangienträgern und Stolonen. Der Abstand von lebenden Hyphen beider Myzelien ist nach dieser Abgliederung im sekundären Hemmungsraum breiter als im primären.

Für vergleichende Messungen kommt der Abstand beider Myzelien an der Verbindungslinie der Myzelmitten in Betracht. Da dieser Abstand aber bis zur Wachstumseinstellung, bis zur definitiven Ausbildung des primären Hemmungsraumes, abnimmt, sind nur solche Breitenangaben vergleichbar, die sich auf gleich lange Hemmungsräume beziehen.

Tabelle 6.

	Dr.	Hemmungsraum Breite/Länge in mm				
Phyc. Blakesleeanus +	10,9		1/17	1/32	0,5/49	0,3/60
Mucor spinosus . . .	10,3		1,5/17	1/33	1/45	0,75/57
Mucor hiemalis + . .	9,2			1/27	0/42	a/52
Mucor mucedo + . .	3,5		1,5/18	1/28	0/46	
Mucor Ramannianus .	1,5	5/5	3/21	2/29	0/45	

Tabelle 6 enthält die Angaben für eine Anzahl von Mucorineen. Der Abstand der Myzelien ist bei umgedrehter Petrischale makroskopisch oder unter dem Präpariermikroskop (Ok. 2 Obj. B O Winkel) mit dem Millimetermaß gemessen und in den folgenden Tabellen im Zähler angegeben, während im Nenner die Länge der Abplattung in mm steht. Die Zahlen beziehen sich auf den primären Hemmungs-

raum. Geimpft wurde in Petrischalen in 4 cm Abstand auf 15 cm^3 1% Agar 2% Malz. Die Kulturen standen bei 20° C im dunklen Thermostaten. Es bedeuten

0 = Hyphenspitzen in gleicher Höhe,
a = „ greifen ineinander,
b = „ dringen schwach,
c = „ „ stark ins andere Myzel ein, Verfilzung.
Dr. = Zuwachs in 24 Stunden.

Die Betrachtung von der Fläche her wurde ergänzt durch Beobachtungen von der Seite an ausgestochenen schmalen Agarstreifen aus der Hemmungsraummitte. Es sei auf diese Querschnittsbilder für die fünf angeführten Formen näher eingegangen.

1. Der Hemmungsraum des *Phycomyces Blakesleeanus* (Burgeff). Das Myzel wächst normal im oberen Drittel des

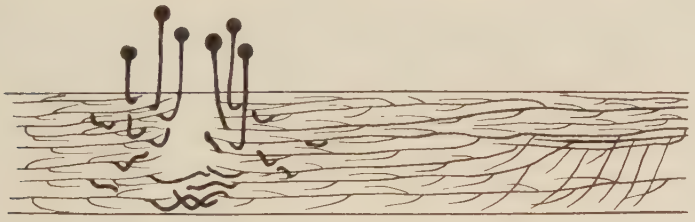

Fig. 7.

Nährbodens. Es wird auch der untere Teil des Substrats von Hyphen durchzogen. Es sind dies Seitenhyphen, die vom Hyphenmaximum ausgehen und nach Einkrümmung parallel zum Boden verlaufen, bis sie fortschreitend durch neu herabkommende Hyphen ersetzt werden. Bei Annäherung an den Hemmungsraum wird diese Verteilung aufgegeben und das Substrat in allen Höhenlagen wie auf armem Boden ziemlich gleichmäßig durchzogen. Die Hyphenspitzen befanden sich ursprünglich ungefähr in gleicher Höhe, sind dann aber abgegliedert und schlecht sichtbar. Der sekundäre Hemmungsraum ist 1,5 mm breit. In einer ca. 2 mm breiten Zone proximal vom Myzelrand entstehen hinter den Hyphenspitzen oder seltener aus ihnen selbst die angeschwollenen, oft schraubig gekrümmten Zwergsporangienanlagen. Im oberen Teil des Substrats wachsen diese sofort aërotropisch in die Höhe und werden Zwergsporangien, im unteren wachsen sie unter Windungen umher und kommen von beiden Myzelien aus durcheinander. Durch diese in-

einanderwachsenden, verhältnismäßig kurz bleibenden keulig angeschwollenen Hyphen ist der Hemmungsraum am Grund enger als oben. Die submersen Hyphen krümmen sich im Hemmungsraum undeutlich nach oben (auf höheren Konzentrationen deutlicher). Fig. 7 zeigt den sekundären Hemmungsraum halbschematisch.

2. *Mucor spinosus* (van Tieghem) wächst auf 2 % Malz im oberen Drittel des Substrats. Von dort aus gehen schräg nach vorn Hyphen in die unteren Schichten, wo sie bald ihr Wachstum einstellen. Am Myzelrand sind diese Bodenhyphen ca. 1 mm hinter den oberen zurück. Ca. 5 mm vor dem Hemmungsraum gehen die Hyphen dazu über, das Substrat gleichmäßig zu durchziehen. Auf 0,3—1 mm Nähe stellen sie ihr Wachstum ein, nachdem sie vorher kurz aufwärts abgebogen waren. Sie bilden alsdann kurz hinter der abgegliederten Spitze lange, dünne, unverzweigte Hyphen aus, die sich im oberen Teil aufwärts krümmen und Sporangienträger werden, im unteren am Grunde bogig umher wachsen, wobei sie 1 mm tief ins andere Myzel geraten können. In einiger Entfernung von der Hemmungsraummitte verlaufen sie oft chemotropisch abgelenkt parallel zur Hemmungsgasse (Fig. 8).

Fig. 8.

3. *Mucor hiemalis* (Wehmer) wächst normal ähnlich wie *Mucor spinosus*. Nach dem Hemmungsraum zu geht er durch Abbiegen von Hyphen aus dem dichteren Teil in eine gleichmäßige Verteilung über. Abplattung tritt ein, eine typische Gasse wird nicht ausgebildet. Die Hyphen wachsen bis dicht aneinander und biegen dann flach nach oben aus, wobei sie bis 1,5 mm tief durcheinander geraten. Sie werden dann selbst Lufthyphen oder geben dicht hinter der Spitze solche ab. Am Grund ist der Hemmungsraum durch Aufwärtsbiegen hyphenarm und dadurch kenntlich (Fig. 9).

4. *Mucor Ramannianus* (Moeller) verhält sich ähnlich, nur tritt Hemmung schon in größerem Abstand ein. Die Hyphen dringen auch weniger tief ineinander ein.

5. *Mucor mucedo* (Brefeld) wächst schon auf 2% Malz an der Oberfläche und entsendet steil nach vorn einfallende Seitenhyphen zum Boden. Wie bei *Mucor spinosus* gehen auch allmählich nach vorn einfallende Hyphen ab, die aber nicht hervortreten. Am Hemmungsraum kommt es kaum zu einer Änderung der Verteilung. Die Hyphen wachsen an der Oberfäche bis zur Berührung,

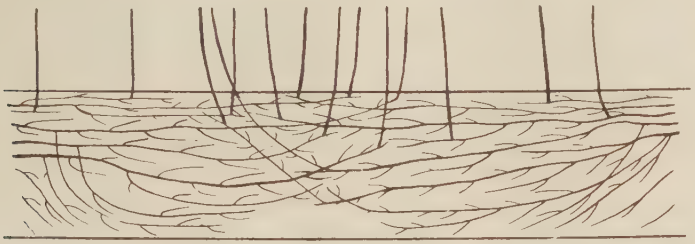

Fig. 9.

wobei sie dünner und weniger dicht sind, und stellen dann ihr Wachstum ein; am Grund ist der Hemmungsraum ungefähr 1 mm breit. Diese Breite fällt gleichmäßig nach der Oberfläche zu 0 ab. Sporangienträger werden nur aus den oberflächlichen Hyphen gebildet. Fig. 10 zeigt den primären Hemmungsraum schematisch. Die Art der Ausbildung des sekundären Hemmungsraumes ist für die einzelnen Formen charakteristisch, die des primären nicht. So sieht letzterer bei *Phycomyces Blakesleeanus* + auf etwas höher konzentrierten Böden wie bei *Mucor spinosus*, auf solchen, auf denen er bereits oberflächlich wächst, wie bei *Mucor mucedo* aus.

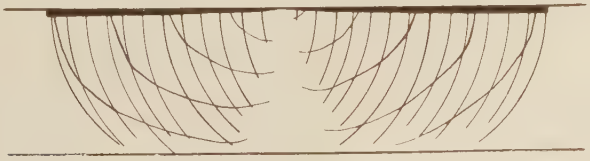

Fig. 10.

Ich sah *Phycomyces Blakesleeanus* und *Mucor spinosus* allerdings nie nach Art des *Mucor hiemalis* reagieren, weil beide erst bei so hohen Konzentrationen ineinander wachsen können, bei denen sie bereits an der Oberfläche zu finden sind, und sich dann wie *Mucor mucedo* verhalten. Diese Anordnung in der Oberfläche ist der Ausbildung einer Hemmungsgasse am ungünstigsten, da bei nicht

völliger Durchwachsung und Ausnutzung der unteren Substratschichten einerseits noch Nährstoffe herauf, andererseits etwaige Stoffwechselprodukte hemmender Art abdiffundieren können.

In diesen Versuchen ist stets dafür gesorgt worden, daß der Impfabstand in den Kulturen gleich war, weil ein Versuch gezeigt hatte, wie sehr die Hemmungsraumbreite hiervon abhängig ist.

Auf 12 ccm 1 % Malz, 1 % Agar wurde mit Keimmyzelien von *Phycomyces Blakesleeanus* + in verschiedenen Abständen geimpft und die Länge und Breite des Hemmungsraumes gemessen. Der Zuwachs für 24 Stunden war ca. 6 mm (Tab. 7).

Die Breite nimmt mit dem Impfabstand zu, wie das auch Müller (1922) angibt, und wie es nach dem Vorhergehenden ohne weiteres zu erwarten ist. Zwischen 4 und 6 cm ergibt sich kaum noch ein Unterschied. Es ist deshalb bei den Versuchen stets in 4 bezw. 5 cm Abstand geimpft worden.

Tabelle 7. *Phycomyces Blakesleeanus* +. Impfabstand.

cm Abstand	1	3	4	6	8
		3,5/0			
		2/15	4/15		
Hemmungsraum	0/27	2/24	3,5/22	3,5/25	
Breite/Länge in mm		2/29	3/28	2,5/35	3,5/28
	0/43	2/43	2,5/44	2,2/44	
	0/56	1,5/55	2/57		

2. Die Ursache der Hemmung auf Malzböden.

a) Hemmungsraum und Nährstoffkonzentration.

Bei den Mucorineen nimmt im Gegensatz zu den Angaben Müllers für *Saprolegnia* die Hemmungsraumbreite mit steigender Ernährung ab, wie das der folgende Versuch zeigt, bei dem auf 15 ccm Agar mit 10—3—0,5 % Malz in 5 cm Abstand mit Myzel geimpft war. Die Substratreaktion war bei den Mucorineen stets lackmussauer, bei *Saprolegnia* auf Malz mit Peptonzusatz wird sie allmählich alkalisch. Tab. 8 zeigt die Resultate für *Phycomyces Blakesleeanus*. Dr. gibt den Zuwachs für 12 Stunden an (26. bis 38. Stunde). Die Messungen stammen von je zwei Kulturen. Die Breite wurde mikroskopisch bestimmt. Versuche mit *Mucor spinosus* und *Mucor mucedo* zeigten das gleiche Resultat sehr deutlich.

Tabelle 8a. *Phycomyces Blakesleeanus* +.

Malz-Konzentration	10	3	0,5 %
Dr. 12 Std.	7,25	5,5	3,75 mm
Hemmungsraum Breite/Länge in mm	2/0 0/17	3/0 2/28 1/46 0,75/70	4,25 3/33 2/44 1,5/63

Tabelle 8b. *Saprolegnia Thureti.*

Malz-Konzentration	3	0,3	0,02 %
Pepton- „	1	0,1	—
Dr. 12 Std.	6	5,2	5,5 [1])
Hemmungsraum Breite/Länge in mm	0/24 b/49 c/60	a/36 a/46 b/60	0/30 0/41 a/55

Der Beginn der Hemmung tritt bei niederen Konzentrationen bei weiterem Abstand ein, und die definitive Breite bleibt größer als bei höheren Konzentrationen. Das trifft auch für *Saprolegnia Thureti* zu. Die Hemmung tritt hier nur schwächer ein und der Abstand bleibt undeutlich (Tab. 8b). Danach geht auch hier eine Abnahme mit besserer Ernährung parallel. Der Querschnitt zeigt eine Myzelanordnung vorwiegend an der Oberfläche und im oberen Drittel des Substrats, das aber auch sonst bis zum Boden durchwachsen ist. Der Hemmungsraum selbst sieht dem des *Mucor hiemalis* (Fig. 9) ähnlich. Auf 3 % Malz 1 % Pepton ist nach einiger Zeit die Hemmungslinie nicht mehr erkennbar — „c“ —, bei 0,3 % Malz 0,1 % Pepton nur an der kümmerlichen Ausbildung des Luftmyzels.

Der Versuch sagt darüber, ob Nährstoffmangel oder Stoffwechselproduktwirkung vorliegt, nichts aus. Es könnten bei langsamerem Wachstum auf schlechten Böden die Hemmungsstoffe weiter vorausdiffundiert sein und das Gegenmyzel so schon bei größerem Abstand erreichen.

Es müßte dann die Hemmungsbreite der Ausbreitungsgeschwindigkeit parallel gehen. Für diesen Versuch schien dies

1) mikroskopisch ermittelt.

zuzutreffen; bei *Saprolegnia* geht mit geringem Unterschied in der Ausbreitungsgeschwindigkeit eine deutliche Änderung der Hemmungsbreite parallel.

Um zu sehen, wie sich *Phycomyces Blakesleeanus* beim Zusammenwachsen auf so hoch konzentrierten Böden verhielt, bei denen bereits Hemmung in der Ausbreitungsgeschwindigkeit eintrat, wurden auf 12 ccm 1proz. Agar mit 10, 15, 20, 25 % Malz (gr M. auf 100 ccm Agar) Impfklötzchen in 4 cm Entfernung aufgegeben. Dr. ist der Zuwachs von der 28.—40. Stunde (Tab. 9).

Tabelle 9. *Phycomyces Blakesleeanus* +

Malz-Konzentration	10	15	20	25 %
Dr. 12 Std.	9,5	8,75	8	7,5 mm
Hemmungsraum Breite/Länge in mm	a/20 c/46	a/19 c/36	a/20 c/37	0/7 c/31

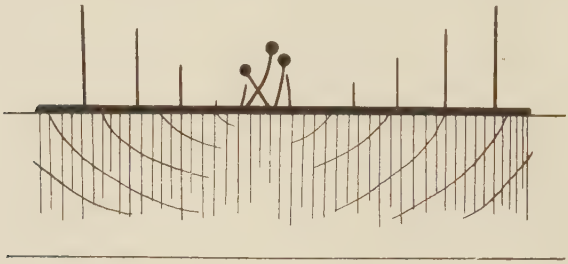

Fig. 11.

Trotz deutlicher Wachstumshemmung ist keine Verbreiterung konstatierbar. Die Abplattung ist bei allen Konzentrationen bis zur Berührung undeutlich. Die Hemmungslinie ist anfangs an einer dünnen Rille in der Substrathaut kenntlich; bald aber tritt Verfilzung mit Lufthyphen und Zwergsporangien ein, so daß die Stelle des Aufeinandertreffens nur noch am Rande erkennbar ist. Im Querschnitt am umgelegten Agarstreifen ist die Hemmungslinie nur durch eine dichte Reihe von Zwergsporangien kenntlich. Die Substrathaut ist hier genau so dicht wie im übrigen Myzel. Von ihr aus gehen Hyphen — nach vorn etwas einfallend — fast senkrecht zum Grund. Das ist auch im Hemmungsraum der Fall, nur sind sie hier etwas dünner. Flacher verlaufende submerse Hyphen stellen in einiger Entfernung voneinander das Wachstum ein, wofür auch

O_2-Mangel verantwortlich gemacht werden könnte. Bei 10 % Malz reichen die Hyphen bis auf den Boden; bei 25 % ist der Grund hyphenfrei; 15 und 20 % sind Übergänge. Das Schema für 25 % Malz gibt Fig. 11.

Angesichts der verschiedenen Hemmungsraumbreite an der Oberfläche und im unteren Substrat erhebt sich die Frage, ob Hemmungsräume auf Konzentrationen, bei denen submerses Wachstum stattfindet, nicht durch O_2-Mangel beeinflußt werden und ob Vergleiche mit oberflächlich wachsenden Myzelien zulässig sind. In Petrischalen wurden auf Agarböden von 0,5, 3 und 10 % Malz große Zelloidinmembranen (6 : 6 cm) gelegt, und darauf mit Myzel in 4 cm Abstand geimpft. Bei 10 % Malz berührten sich die Myzelien in Kreisform, eine Hemmungslinie war anfangs deutlich, doch trat bald Verfilzung ein, so daß die Myzelien, wenn man sie beiderseits mit der Pinzette ergriff, nicht mehr glatt trennbar waren. Auf 3 % Malz greifen die Hyphen ineinander, sind aber leicht trennbar; auf 0,5 % Malz bleibt ein Abstand von 0,0—0,2 mm. Daß der Hemmungsraum bei dieser Anordnung enger wird, ist verständlich. Das Substrat wird hier nicht durchwachsen, so daß einerseits noch unausgenutzte Nährstoffe hochdiffundieren, andererseits aber Stoffwechselprodukte nach unten abgegeben werden können. Das nachträgliche Auswachsen von zahlreichen Seitenhyphen bei 10 % Malz, das zur Verfilzung führt, ist mit ersterer Annahme befriedigender zu erklären.

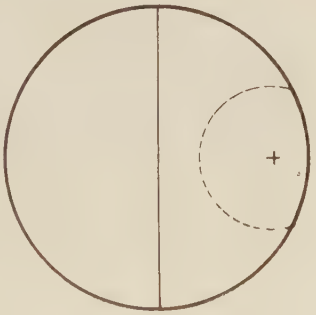

Fig. 12.

b) Hemmungsraum ohne entgegenwachsendes Myzel.

Wenn Nährstoffmangel die hemmende Ursache ist, so muß sich ein typischer Hemmungsraum auch ohne entgegenwachsendes Myzel hervorrufen lassen. Es wurde zu dem Zweck in den Agarboden, wenn das Myzel einen Radius von 2 cm erreicht hatte, mit dem Spatel eine gerade Linie eingeschnitten und der abgetrennte noch unbewachsene Agar herausgehoben. Der Abstand der Agargrenze vom Myzel betrug ungefähr 1 cm (Fig. 12).

Sowohl *Phycomyces Blakesleeanus* wie auch *Mucor spinosus* bilden hier einen ganz typischen Hemmungsraum $^1/_2$-normaler

Breite aus. Nach Abplattung ist der Abstand von der Agargrenze in der Mitte am größten und nimmt nach den Seiten zu ab, wo Ablenkungen nach außen typisch sind. Die Hyphen können hier die Grenze erreichen, bezw. bei höherer Konzentration noch aufs Glas herunterwachsen. Der Abstand in der Mitte des Hemmungsraumes betrug bei *Phycomyces* auf 2% Malz ca. 1 mm. Unregelmäßige Krümmungen sind hier häufig. Die Abgliederung der Hyphenspitze und die Ausbildung von Zwergsporangien erfolgt normal. Auf 10% Malz wird Abplattung und Hemmungsraum nicht mehr ausgebildet. Ein Beweis gegen die Annahme, daß Hemmungsstoffe das Ineinanderwachsen hindern, ist diese Wachstumseinstellung jedoch nicht. Eine relativ starke Anreicherung von Stoffwechselprodukten muß ja auch hier eintreten, da keine Abdiffusion möglich ist.

An Stelle des ausgestochenen Agars wurde aus Glas destilliertes Wasser eingegossen. Es fand dann Abplattung statt, die Hyphen wuchsen aber langsam in gerader Linie in das Wasser ein. Da dieses allerdings schon, bevor es von den Hyphen erreicht wurde, Nährstoffe ausgewaschen hat, wurde im nächsten Versuch das Wasser erst zugegeben, wenn das Wachstum an der Agargrenze eingestellt war. Auch hier fand langsam ein schwaches Wiederauswachsen statt. Die Hyphen wachsen auch weiter, wenn statt des aqu. dest. gebrauchte Nährlösung des gleichen Pilzes zur Verwendung kam. (Diese wurde aus Kulturen in Petrischalen auf 30 ccm Malzlösung erhalten. Nach Durchwachsen wurde die Lösung vor der Fruktifikation abgegossen und verwandt.)

Wenn diese Versuche auch leichter durch Annahme von Hemmungsstoffen erklärbar sind, so zeigt das folgende Resultat, daß Nährstoffmangel entscheidend war (zu den Versuchen s. a. S. 576 ff.): Legt man in die Mitte eines solchen Hemmungsraumes festes Malz, so tritt gleichfalls Wiederauswachsen ein. Von Wichtigkeit ist die Tatsache, daß die Abplattung von 10% über 3% zu 0,5% Malz stark zunimmt, auch wenn der ausgestochene Agar durch steriles Wasser ersetzt ist. Da Abdiffusion der Stoffwechselprodukte in allen drei Fällen gleich gut möglich ist, ist der Prozeß der Abplattung der starken Herabsetzung der Ernährung zuzuschreiben. Das steht in gutem Einvernehmen zu dem, was in früheren Versuchen über den Einfluß der Nährstoffmenge auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit gesagt ist.

c) Stickstoffmangel als Ursache der Wirkung.

In den nächsten Versuchen untersuchte ich genauer, inwieweit auf das Nichtdurchwachsen des Hemmungsraumes die Ernährung von Einfluß ist.

Auf Hemmungsräume, die in der Mitte von mehreren kreisförmig angeordneten Myzelien des *Mucor spinosus* gebildet und besonders breit waren, wurde feste Substanz verschiedener Stoffe aufgebracht. Bei $MgSo_4$, KH_2PO_4, K_2CO_3 und Glukose „Kahlbaum“ bildete sich aus osmotischen Gründen ein makroskopisch sichtbarer kahler Fleck aus. Veränderungen der Hemmungsraumbreite sind auch mikroskopisch nicht erkennbar. Das ist auch bei $CaCO_3$ nicht der Fall. Bei NH_4NO_3 und neutralem Ammoniumphosphat ist der Hemmungsraum deutlich enger geworden, bei Malz und Pepton „Witte“ ist er dicht zugewachsen, wobei die Hyphen beider Myzelien durcheinandergehen. Bei den Elektrolyten wurde die aufgegebene Menge nach einiger Zeit erneuert. Dadurch wurde die Reaktion auf die Ammoniumsalze erheblich deutlicher. Es bildete sich hier um die kahle Stelle ein Hof von durcheinanderwachsenden, besonders anisotroph reagierenden Hyphen. Zukrümmungen waren nicht selten. Häufig wuchsen die Träger im unteren Substrat aus, verzweigten sich und verengerten so den Hemmungsraum. Versuche ergaben für *Phycomyces Blakesleeanus* ebenfalls, daß nach Zugabe von N-Nahrung — Ammoniumsalze, Pepton, Asparagin, Glykokoll, und Harnstoff, in geringerem Maß nach Alanin — Durchwachsen des Hemmungsraumes eintritt, nicht aber nach Aufgabe von Kohlehydraten, Mg-, K- und P-Salzen. Auch Neutralisation des lackmussauren Agars mit Karbonaten führt keine Veränderung herbei.

Damit ist einwandfrei gezeigt, daß auf Malzagar Stickstoffmangel im Hemmungsraum besteht. Für „Malthyl Gehe“ gibt König (1883) eine Analyse an:

7,02	N-Substanz	
0,22	Fett	
32,02	Zucker	} Kohlehydrate
56,00	Dextrin	
0,42	unlösliche	
1,64	Asche	
0,55	Phosphorsäure	Rest H_2O.

Bei dem geringen Verbrauch an Aschebestandteilen (Benecke, Günther) und der großen vorhandenen Menge von Kohlehydraten

ist danach tatsächlich zu erwarten, daß zuerst Stickstoffsubstanzen ins Minimum kommen werden, zumal beim Sterilisieren noch Eiweiß ausfällt.

Daraus ergibt sich für unser Problem, daß bei den verwandten Arten auf Malzböden ein Hemmungsraum auf Grund von N-Mangel eintritt; für die andere noch mögliche Erklärung, daß das Verhältnis von Stoffwechselprodukten zur Ernährung maßgebend sei, d. h. daß mit besserer Ernährung mehr Stoffwechselprodukte vertragen würden, liegt kein zwingender Grund vor. Sie ist als umständlicher abzulehnen. Auf hohen Konzentrationen wird deswegen kein Hemmungsraum ausgebildet, weil hier kein N-Mangel eintritt. So wird auch verständlich, warum Trägeranlagen als Hyphen, die von hinten her vom Myzel vorgetrieben werden, den Hemmungsraum ungehemmt durchwachsen können.

Diese Verhältnisse scheinen auch auf *Saprolegnia* bei Kultur auf Malz mit Peptonzusatz übertragbar. Abplattung tritt ein durch plötzliche Herabsetzung der Ernährung beim Aufeinandertreffen der beiden Diffusionsgefälle zum Myzelrand.

Es liegt nun nahe, nach Hemmungsräumen zu suchen, die nicht durch N-Mangel verursacht sind. Ehe dem weiter nachgegangen wird, seien noch verschiedene Versuche angeführt, die z. T. noch diese Schlüsse stützen, z. T. aber den Einfluß verschiedener Außenfaktoren auf die Ausbildung des Hemmungsraumes behandeln.

d) Trennung der Myzelien durch Membranen verschiedener Durchlässigkeit.

In einer Petrischale wird aus einem Agarboden von 12 ccm ein kleines Stück ausgestochen und durch einen Impfklotz ersetzt. Darüber kommt eine Zelloidinmembran (6 : 6 cm), auf die in 4 cm Abstand vom ersten ein zweiter Impfklotz aufgesetzt wird.

Bei 3% Malz stellen die Myzelien beim Aufeinandertreffen ihr Wachstum nach Abplattung ein; sie sind mit den Hyphenspitzen etwas übereinander gewachsen. Das Obermyzel bildet typische Zwergsporangien, das Untermyzel nur Anlagen dazu aus. Nach einiger Zeit fangen im Untermyzel Hyphen an, von der Spitze her abzusterben, und das Obermyzel überwächst es langsam, noch gerade kreisförmig geschlossen, mit dünnen Hyphen.

Bei 10% Malz tritt nur schwache Abplattung ein, das Obermyzel überwächst das untere, wenn auch mit dünneren Hyphen und weniger dicht. Es war die gerade Linie des Zusammentreffens gut

daran zu erkennen, daß die Dicke der Substrathaut plötzlich erheblich geringer wurde. Das Untermyzel bildet an dieser Linie einen Längswulst aus und entsendet — wohl aus O_2-Mangel — nur wenige Hyphen ein Stück weit unter das Obermyzel. Vor diesem Längswulst verläuft entsprechend ein schwächerer im Obermyzel. Diese Wülste sind ohne Annahme von stimulierenden Stoffen erklärbar: Der überwachsende Teil des Obermyzels ist hinsichtlich der Ernährung, der unterwachsende des Untermyzels hinsichtlich der O_2-Versorgung ganz wesentlich schlechter gestellt als die Hyphen zentral von der Hemmungslinie. Infolgedessen wächst nur ein Teil der Hyphen weiter. Dem nichtauswachsenden Teil ist an der Hemmungslinie selbst noch Wachstum möglich; beim Untermyzel durch noch genügende Sauerstoffversorgung, beiden Myzelien durch Hinzudiffusion von Nährstoffen aus dem nicht ausgenutzten Agar unter dem Obermyzel. Fig. 13 gibt ein Querschnittschema.

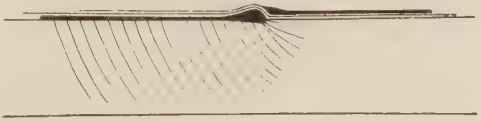

Fig. 13.

In einer Anzahl von Kulturen wurde die Membran mit dem Obermyzel abgehoben. Geschah das gleich nach dem Zusammentreffen, so wachsen auf 3 % Malz die Hyphen wie in einer Hungerkultur kümmerlich weiter. Bei 10 % Malz ist das weiterwachsende Myzel geschlossen, aber wenig dicht. Hob man die Membran erst nach völliger Einstellung des Wachstums ab, so wuchs auf 3 % Malz das Myzel nicht mehr weiter, auf 10 % äußerst kümmerlich.

Bei einigen Kulturen wurde nach dem Abheben der Membran der unbewachsene Agar senkrecht zum Myzelrand halbiert und in Reagenzgläser gefüllt. Die eine Hälfte blieb unerhitzt, die andere kam entweder 15 Min. in ein Wasserbad von 80° C oder in den Autoklaven bei 100° C zur Vernichtung thermolabiler Stoffwechselprodukte (Lutz, 1909). In allen Fällen ergab sich nach Impfen mit Sporen von *Phycomyces Blakesleeanus* langsames Keimen und kümmerliches Wachstum ohne Unterschiede. Thermolabile Hemmungsstoffe waren also nicht nachweisbar. Die Kulturen standen — wie stets — im dunklen Thermostaten.

Diese von Lutz und anderen postulierten Stoffe müssen ihren Eigenschaften nach (Enzyme? Lutz, Küster) als Kolloide aufgefaßt

werden. Es müßte also möglich sein, sie durch Verwendung von Dialysiermembranen auszuschalten. Kollodiummembranen aus einem Präparat „Kollodium zur Herstellung von Membranen zur Dialyse" (Kahlbaum) wurden nun an Stelle von Zelloidin in der letzten Versuchsanordnung verwandt. Sie waren für Eosin noch, für Kongorot nicht mehr durchlässig. Auf 25% Malz + 0,3% Pepton überwuchs *Phycomyces Blakesleeanus* auf Zelloidinmembranen das Untermyzel glatt und ohne jede Abplattung, auf Kollodiummembranen fand deutlich eine schwache Abplattung statt. Dies letztere Ergebnis kann nur im Sinne einer schlechteren Ernährung gedeutet werden. Die leicht diffundierenden N-Substanzen werden nach dem Zusammentreffen in ihrer Menge stark herabgesetzt, während Pepton die Dialysiermembran nicht zu passieren vermag. Das macht sich auch dahin geltend, daß das Obermyzel auf Zelloidinmembranen viel schneller das Untermyzel überwächst als auf Kollodiummembranen[1]).

3. Der Einfluß verschiedener Außenfaktoren auf den Hemmungsraum.

a) Beeinflussung der Diffusionsgeschwindigkeit.

Als Außenfaktoren, die die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflussen, sind dann Agarkonzentration und Temperatur variiert und die Wirkung auf den Hemmungsraum geprüft worden. Um Anhaltspunkte über die Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit zu haben, wurden Vorversuche mit Farbstoffen angestellt. Eosin (das noch als molekulardispers angesehen werden kann) und Kongorot (als mitteldisperses Kolloid) wurden in flüssigem Agar (ca. 60°) gelöst. Gleichgroße ausgestochene Agarblöcke mit Farbstoff kamen dann auf Agarböden der verwendeten Konzentration, die zwei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt wurden. In Tabelle 10 ist die Diffusionsgeschwindigkeit für 24 Stunden angegeben.

1) Auf einem Boden nur mit Kristalloiden von der Zusammensetzung:

1,0 % Agar,	0,2 % K_2HPO_4,
1,0 „ Glukose,	0,1 „ KH_2PO_4,
0,4 „ NH_4NO_3,	0,1 „ $MgSO_4$

ergab sich für *Mucor spinosus*, der hier sehr kräftig wuchs, bei der Verwendung von Zelloidin- und Kollodiummembranen kein Unterschied. Es tritt in keinem Fall Überwachsung ein. Nach Abheben des Obermyzels wächst das Untermyzel nicht weiter. Der Versuch sei angeführt, trotzdem der Gegenversuch mit kolloiden Nährstoffen fehlt.

Tabelle 10.

		Agar	0,4	1,2	2,4 %
18—21° C		Eosin . . .	11,5	12,0	11,0 mm
		Kongorot . .	5,25	4,0	2,5 „
12—14° C		Eosin . . .	10,0	10,5 mm	—
		Kongorot . .	4,75	3,3 „	—

Der Unterschied für verschiedene Temperaturen ist deutlich. Für Eosin ist eine Änderung bei anderer Agarkonzentration nicht nachweisbar. Nach 6 Stunden war allerdings eine geringe Differenz vorhanden. Eine nur unwesentliche Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit von 3 % zu 1 % Agargallerte findet auch Voigtländer (1889) für Salze. Die Diffusionsgrenze verläuft bei Eosin äußerst unscharf. Da bei der Diffusion die Gallerte wie ein Sieb wirkt (Liesegang, 1924), ist es gut vorstellbar, daß erst bei sehr hochprozentigen Gallerten auch für kleine Moleküle Verlangsamung durch Verengerung der Maschen eintreten wird. Für größere Moleküle, wie beim Kongorot, liegen die Verhältnisse wesentlich anders. Die Diffusionsgrenze ist hier ziemlich scharf, was möglicherweise auf kolloidchemische Ursachen — Adsorption — zurückzuführen ist. Die Diffusion verläuft anfangs in beiden Fällen rascher, eine Erscheinung, die ja bei Gallerten allgemein auftritt.

Man ersieht daraus, daß innerhalb der praktisch verwertbaren Agarkonzentrationen sich nur in der Diffusionsgeschwindigkeit der kolloid-dispers gelösten Stoffe ein Unterschied zeigt (abgesehen von unübersehbaren Einwirkungen der Adsorption).

Es ergibt sich für *Phycomyces Blakesleeanus* auf 1 % Malz und 0,4, 1,2, 2,4 % Agar eine deutliche Abnahme der Hemmungsraumbreite mit steigender Agarkonzentration aus Tabelle 11.

Tabelle 11. *Phycomyces Blakesleeanus.* 1 % Malz.

Agar	0,4	1,2	2,4 %
Dr. 24 Stunden . .	7,25	8,0	7,5 mm
Hemmungsraum-Breite/Länge . .	1,0—1,5/65	0,75—0,3/63	0,5—0/62
Dr. 3 % Malz . . .	9,5	11,0	10,25 mm

Die Maße für den Hemmungsraum sind am Querschnitt mit Ok. 2 Obj. B 2 Winkel gemessen. Dasselbe ergibt sich für höhere Malzkonzentrationen und für *Mucor spinosus.*

Die Wachstumsgeschwindigkeit hat bei 1,2 % Agar ein Maximum, was auch bei 3 % Malz (Tab. 11 letzte Reihe) zu sehen ist. Für *Saprolegnia* ergab sich weder in der Geschwindigkeit noch in der Hemmung ein einwandfreier Unterschied bei den gleichen Agarkonzentrationen mit $^1/_2$ % Malz und $^1/_2$ % Pepton.

Das Resultat ist so zu verstehen, daß die Diffusion eines erheblichen Teils der N-Nahrung erschwert ist. Der Diffusionshof um das Myzel ist enger und steiler und stößt daher von beiden Seiten später zusammen.

Ganz im Gegensatz dazu geht mit Herabsetzung der Diffusionsgeschwindigkeit Verbreiterung des Hemmungsraumes mit abnehmender Temperatur parallel, wie das für *Mucor spinosus* in Tabelle 12 gezeigt wird. *Phycomyces Blakesleeanus* wächst bei tiefer Temperatur sehr schlecht.

Tabelle 12. *Mucor spinosus.* Dr. in mm für 24 Stunden.

Malz		1	3	6 %
Dr. 19—21° C		6,2	8,9	17 mm
Dr. 11—14° C		4,2	6,0	8 „
Hemmungsraum-Breite/Länge	19—21° C:	4,0/16 3,5/23 2,0/54	1,5/12 1,2/26 0,5/55	0/30 a/50 b/67
	11—14° C:	6,0/16 4,5/22 2,5/52	2,5/14 1,5/23 0,8/68	2,0/17 0,5/49 0,2/61

Es fällt hier die Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit mehr ins Gewicht als die der Diffusionsgeschwindigkeit. Eine Abnahme der Gassenbreite mit steigender Ernährung ist wieder deutlich.

b) Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Mehrere Versuchsreihen dienten der Untersuchung des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration. Die bisher verwandten Nährböden waren stets sauer. Die p_h der Malzkonzentrationen war ca. 6,0 für 3 %, 6,3 für 2 %, 6,7 für 1 % Malz[1]).

1) Die p_h bestimmte ich mit den Michaelisschen Indikatoren und der Apparatur von E. Bresslau, 1924. (Röhrchenweite 5 mm. Das Verhältnis der Untersuchungsflüssigkeit zur Indikatorlösung wie 10 : 1. Beobachtung vor Milchglas, bei gefärbten Lösungen mit Blende und Vergleichsröhrchen.) Beobachtungsfehler dürften bei wenig gefärbten Lösungen 0,1, bei stark gefärbten — insbesondere bei alkalischen — 0,2 nach jeder

Filtrierter Malzagar wurde mit bestimmten Mengen K_2CO_3 versetzt und nach zweimaliger Sterilisation ohne Druck je 10 ccm in Petrischalen auspipettiert. Die p_h wurde mit 5 ccm Agarlösung vor dem Versuch bestimmt. Tabelle 13 enthält die Werte für 3 % Malz und 0,00, 0,03 und 0,14 % K_2CO_3. Versuche mit 1 und 2 % Malz zeigten das gleiche.

Tabelle 13. *Phycomyces Blakesleeanus.* 3 % Malz.

K_2CO_3 %	0	0,03	0,14 %
p_h vor dem Versuch	6,1	7,5	8,7 %
nach 96 Stunden	sauer	schwach sauer	alkalisch
Dr. 24 Stunden	10,7	10,2	7,0 mm
Hemmungsraum-Breite/Länge	a—0/76	0,25/56	1,75/49
Substrathöhe	1,3	1,3	1,4 mm

Die zwei letzten Reihen beziehen sich auf die mikroskopische Messung des Querschnitts.

Um einen größeren Bereich zu umspannen und eine nachträgliche Veränderung der Substratreaktion, wie sie dieser Versuch zeigte, zu vermeiden, wurde alsdann bei weiteren Versuchen mit gepufferten Substraten gearbeitet. Phosphatgemische wurden nach den Angaben von Sörensen (Michaelis, 1914; Höber, 1922) hergestellt, dabei aber statt Na_2HPO_4 das K_2HPO_4 verwandt. Aus Tabelle 14a ist für *Phycomyces Blakesleeanus* (je eine Kultur), aus Tabelle 14b für *Mucor spinosus* (je zwei Kulturen) das nähere zu ersehen.

Bei der p_h-Bestimmung nach dem Versuch ist folgendermaßen vorgegangen: Nach Erreichen einer Hemmungsraumlänge von 40 mm wurde 1. der noch unbewachsene Agar, 2. Agar mit Myzel aus dem Hemmungsraum in Reagenzgläser gefüllt. Bei Bestimmung nach Versuchen mit ungepufferten Böden wurde stets myzelfreier Agar verwandt. Nach Verflüssigung wurde 1 ccm mit 0,1 Indikatorlösung versetzt. Es ergab sich, daß nach beiden Bestimmungen keine Veränderung der p_h eingetreten war. Nur bei der letzten

Seite kaum überschreiten. Alle Glasgefäße, die bei der Bereitung der Nährböden und zur Bestimmung der ph zur Verwendung kamen, waren aus Jenaer Glas, nachdem es sich herausgestellt hatte, daß andere Glassorten die ph im besonderen von sauren Lösungen erheblich nach der alkalischen Seite verschoben.

Spalte Tabelle 14a war eine Herabsetzung der Alkalität meßbar. Es handelte sich hier aber um reines K_2HPO_4, das auch schon vor dem Versuch durch Neutralisation des Malzagars einen geringeren als den theoretischen Wert ergeben hatte. *Phycomyces Blakesleeanus* säuert ein alkalisches Substrat an, wie schon Tab. 13 zeigte. In allen Kulturen der Tabelle 14 wurde die Breite makroskopisch und mikroskopisch bei Aufsicht und mikroskopisch im Querschnitt gemessen. In Tabelle 14a sind die Angaben vom Querschnitt angegeben, in 14b von der Aufsicht.

Tabelle 14a. *Phycomyces Blakesleeanus*. 1,5 % Malz.

KH_2PO_4	0,91	0,55	0,27	0,18	0,09 %	—
K_2HPO_4	—	0,48	0,83	0,95	1,07	1,19 %
ph vor dem Versuch	4,6	6,7	7,1	7,3	7,6	7,7 %
ph nach dem Versuch	4,6	6,9	7,2	7,3	7,5	7,2 %
Dr. 24 Stunden	13,5	14,3	12,3	11,3	11,0	11,0 mm
Hemmungsraum-Breite Länge (mikroskopisch)	s/48	0/47	1/45	0,8/47	1,5/40	1,3/37
Hemmungsraum-Breite (makroskopisch)	s—0	1,0	1,5	1,5	2,5	2,0
Substrathöhe	2,2	1,7	1,6	1,7	1,4	1,6 mm

Tabelle 14b. *Mucor spinosus*. 1,5 % Malz.

KH_2PO_4	0,91	0,82	0,55	0,27	0,18	0,09 %
K_2HPO_4	—	0,12	0,48	0,83	0,95	1,07 %
ph vor dem Versuch	4,6	5,9	6,7	7,1	7,3	7,6 %
ph nach dem Versuch	4,5	5,8	6,7	7,1	7,4	7,5 %
Dr. 24 Stunden	13,0	13,5	14,0	12,8	12,5	12,0 mm
Hemmungsraum-Breite Länge (mikroskopisch)	0,2/16	0/19	0/21	0,8/18	0,8/12	1/14
	s/37	s/40	s/42	0/37	0,5/32	0,5/28

Es zeigt sich also mit zunehmender Alkalität eine Verbreiterung des Hemmungsraumes und gleichzeitig eine Herabsetzung der Wachs-

tumsgeschwindigkeit. Bei *Mucor spinosus* ist eine Veränderung des Hemmungsraumes auf der sauren Seite nicht feststellbar. Das Optimum der Ausbreitungsgeschwindigkeit liegt bei beiden Arten auf der sauren Seite und sinkt mit zunehmender Azidität nur langsam ab. Für *Phycomyces Blakesleeanus* geht anscheinend eine Verengerung mit steigendem Säuregrad parallel. Es scheint eine direkte Abhängigkeit der Hemmungsraumbreite von der Wachstumsgeschwindigkeit in diesem Versuch trotz Tabelle 14a Spalte 1 vorhanden zu sein. Hier war die Substrathöhe wesentlich höher, was verengernd wirkt.

Beim Betrachten der Agarausstiche von der Seite zeigt sich für Tabelle 13 eine veränderte Verteilung der Hyphen, und zwar wurde mit zunehmender Alkalität die Oberfläche mehr und mehr gemieden. So wuchsen die Haupthyphen bei 2% Malz ohne Karbonatzusatz vor allem in der oberen Hälfte und nahe an der Oberfläche, bei 0,14% K_2CO_3 in der unteren Hälfte bis zum Boden. Steigende Alkalität wirkt also auf Verteilung, Hemmungsraum und Wachstumsgeschwindigkeit wie eine Herabsetzung der Nährstoffkonzentration. Um über die Ursache etwas aussagen zu können, müßte man Näheres über die Beeinflussung des physikalisch-chemischen Zustandes der Pilze durch die H-Ionenkonzentration wissen. Es ist nur eine starke Quellung pilzlicher Membranen durch Alkalien bekannt, auf die Oxalsäure kaum einwirkt (S. 580). Man könnte an veränderte Permeabilitätsverhältnisse denken. Eine Änderung des physikalischen Zustandes vom Agar kommt nicht in Frage, da dieser sich beiderseits des Neutralpunktes in gleicher Weise verhält (Samec, 1922; Walter, 1923). Möglicherweise ist auch ein Teil der N-Nahrung im alkalischen Medium für den Pilz unangreifbar.

4. Hemmung aus anderen Gründen.

a) Hemmung durch Kohlenstoffmangel.

Es war nach der Feststellung, daß der Hemmungsraum auf niederen Malzkonzentrationen durch N-Mangel verursacht sei, bereits die Frage aufgeworfen worden, ob bei Mucorineen auch Hemmungsräume aus anderen Gründen vorkämen. Die Möglichkeiten ergeben sich schon aus dem Vorhergehenden. Man wird durch Mangel an anderen Nährstoffen, fernerhin auch durch Veränderung der Substratreaktion Hemmungsräume herbeiführen können. Als Beispiel für den zweiten

Fall könnte man schon das Auftreten eines Hemmungsraumes bei hoher Alkalität anführen, wie es oben erwähnt war. Ein besseres Beispiel, das mir der Zufall in die Hände gab, wird späterhin zu besprechen sein.

Den ersten Fall erreichte ich bei *Mucor spinosus* durch geringe C-Gaben. Zu einer Gallerte mit 0,4 % NH_4NO_3, 0,1 % KH_2PO_4, 0,1 $MgSO_4$ gab ich 0,1 bezw. 0,02 % Glukose. Auf 10 ccm Agar entwickeln sich nach dem Impfen in 4 cm Abstand kreisförmig geschlossene Myzelien, die beim Zusammentreffen einen Hemmungsraum bilden. Dieser war nach der Wachstumseinstellung 0,5 bezw. 1,25 mm breit, verengerte sich also gleichfalls mit steigender Konzentration. Diese Hemmungsräume wurden nicht durchwachsen nach Zugabe festen Ammoniumnitrats, sehr wenig und langsam bei Asparagin, sehr schnell bei Glukose „Kahlbaum", Malz und Pepton „Witte".

Mucor spinosus wächst noch kreisförmig geschlossen auf reinem Regenwasseragar und macht dort einen Hemmungsraum von ca. 1 cm Breite, wobei nicht untersucht wurde, ob hier C- oder N-Mangel vorliegt.

b) Hemmung durch zunehmende Ionenazidität.

Wurden bisher nur Hemmungsräume behandelt, für die Nahrungsmangel Ursache war, so kommt im folgenden das Verhalten eines *Mucor* zur Darstellung, bei dem Hemmung aus anderen Gründen vorlag. Bei einem Vorversuch verwandte ich einen neuen *Mucor*, der auf Malzböden verhältnismäßig langsam wuchs. *Mucor Bedrchani*[1]) war der einzige von mir untersuchte *Mucor*, dessen Hemmungsraum mit besserer Ernährung breiter wurde. Es ergab sich ein Maximum der Ausbreitungsgeschwindigkeit und gleichzeitig ein Minimum der Hemmungsraumbreite bei 2 % Malz. Die Substrat-

1) *Mucor Bedrchani* n. sp. Mycelio albo, Hyphis sporangiferis prope ab sporangio sympodialiter ramosis, 1—2 cm altis, sporangiis globosis in statu maturitatis, siccitate aeris, dehiscentibus, colore griseo-fusco. Sporangia diam. 55—*83*—155 μ; Columella ovoidea vel globosa 25—*34*—57 μ longa, 21—*31*—43 μ lata. Sporae globosae diam. 6—*8,1*—10 μ. *Mucor Bedrchani* stammt aus Kairo von Ziegenmist. In reifem Zustand ist das Sporangium durch eine Querwand im Träger abgegliedert. Kulturen auf 3 % Malz ph 6,5—7,5 wurden aus größerer Höhe mit Malzlösung begossen, was die Luft aus dem Myzel gut verdrängte. Die Messungen wurden nach Auflegen eines Deckglases an 40 Sporen und Columellen erster Ordnung und an 30 Sporangien erster Ordnung ausgeführt.

reaktion war sauer. Ich setzte daraufhin eine Versuchsreihe mit 1, 2, 3 % Malz und 0,00, 0,03 und 0,14 % K_2CO_3 an. In je zwei Petrischalen wurde auf 10 ccm Agar in 3 cm Abstand geimpft. Tabelle 15 enthält die Daten. Die Angaben über den Hemmungsraum beziehen sich auf die makroskopische Messung bei Aufsicht und die mikroskopische am Querschnitt.

Tabelle 15. *Mucor Bedrchani.*

Malz in %	1			2			3		
K_2CO_3 in %	0	0,03	0,14	0	0,03	0,14	0	0,03	0,14
ph vor dem Versuch	6,8	—	—	6,4	—	—	6,1	7,5	8,7
ph nach 5 Tagen	6,5	—	—	6,0	—	—	5,6	6,8	7,8
ph nach 7 Tagen	—	7,0	7,4	—	6,8	7,3	—	—	—
Dr. 24 Stunden	8,4	9,0	11,0	8,3	11,2	12,5	7,0	10,2	13,7
Hemmungsraum-Breite/Länge (makroskopisch)	1,8/20	1,8/24	0,8/32	2/20	0,8 36	a/41	4/17	a/28	b/42
Hemmungsraum-Breite/Länge (mikroskopisch)	1/36	1,3/41	0,5/50	1,5/36	0,3/52	a/60	3/27	a/48	b/56
Substrathöhe in mm	2,0	1,5	2,1	1,7	1,5	2,0	1,5	1,7	1,8

In Fig. 14a sind die Kurven für 0,0, 0,03, 0,14 % K_2CO_3 eingezeichnet, wobei 1, 2, 3 % Malz auf der Abszisse, die Wachstumsgeschwindigkeit (Dr.) auf der Ordinate eingetragen sind; in Fig. 14b findet sich dasselbe für die mikroskopisch gemessene Hemmungsraumbreite (Ordinate).

Die Hemmungsraumlänge ist zwar nicht die gleiche, die Zahlen sind aber nach der Wachstumseinstellung gemessen und daher vergleichbar.

Mucor Bedrchani ist also stark säureempfindlich und liebt alkalische Reaktionen im Gegensatz zu den anderen Formen. Auf Malz produziert er selbst Säure. Es ist dies demnach für ihn kein idealer Nährboden. Mit zunehmender Malzkonzentration steigt die Azidität, steigt die Hemmungsbreite, fällt die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Bei 0,03 % K_2CO_3 ist ein Maximum der Wachstumsgeschwindigkeit bei 2 % Malz; hier besteht nach 5 Tagen ungefähr Lackmusneutralität, während bei 3 % Malz das Substrat

schon sauer war. Bei 0,14 % K_2CO_3 sind die Verhältnisse denen der anderen Formen auf sauren Böden ähnlich, nämlich eine Abnahme der Gassenbreite bei steigender Ernährung.

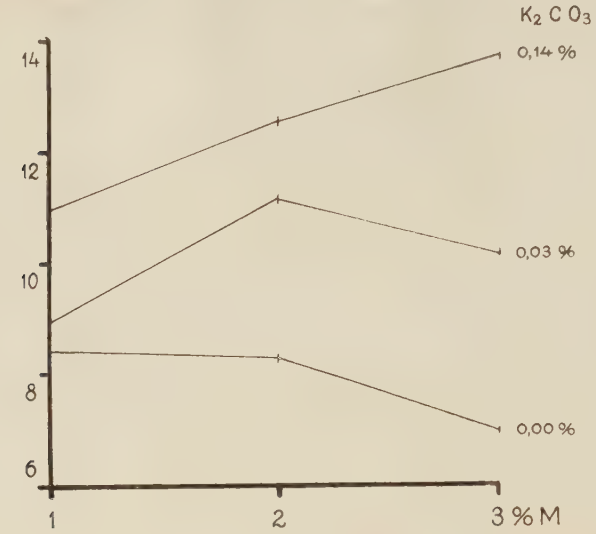

Fig. 14a. Täglicher Zuwachs in mm.

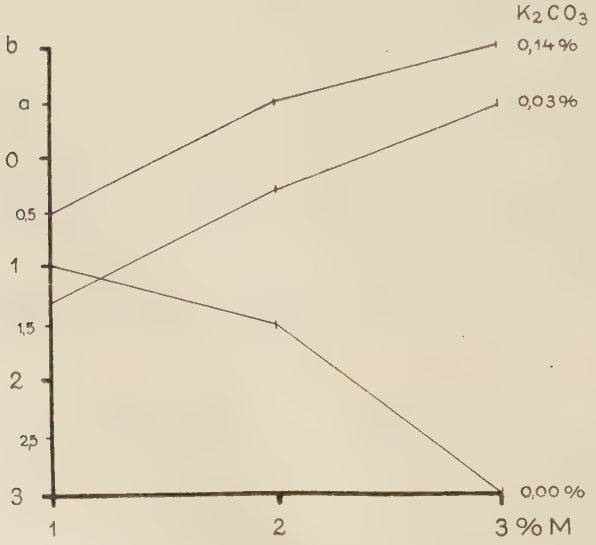

Fig. 14b. Hemmungsraumbreite in mm.

Der Hemmungsraum auf 1 % Malz ist bei K_2CO_3-Zusatz auf Nahrungsmangel, der bei 2 und 3 % Malz ohne Zusatz auf zu

hohe Azidität zurückzuführen[1]). Dem Maximum der Ausbreitungsgeschwindigkeit bei 2 % Malz entspricht kein Minimum der Hemmungsbreite. Es spielt bei der Hemmung Nahrungsmangel, bei der Heraufsetzung der Ausbreitungsgeschwindigkeit die p_H die entscheidende Rolle.

Auch hier war aus den Schalen nach der Wachstumseinstellung Agar in Reagenzgläser gefüllt und zur Hälfte, wie in früheren Versuchen, erhitzt worden. Nach Beimpfung trat sehr kümmerliches und langsames Wachstum ein. Ein Unterschied ergab sich weder in der Keimungsdauer noch in der Entwicklung.

5. Kombination verschiedener Arten.

Eine Reihe von Vorversuchen zeigt schon, daß die Meinung von Boas (1919), die Hemmungsraumbildung sei ein Anzeichen von Verwandtschaft, nicht haltbar ist. In dünnen Agarschichten mit 3 % Malz wurde eine Reihe von Formen gegeneinander geimpft, worüber folgende Übersicht gegeben sei:

Thamnidium elegans Link gegen *Thamnidium elegans*. H.-R. (Hemmungsraum).
„ „ „ *Mucor spinosus* van Tieghem. Kein H.-R. Abplattung. Ablenkung bei *Mucor spinosus*.
„ „ „ *Mucor Mucilagineus* + Brefeld. H.-R.
Mucor Mucilagineus + „ *Mucor spinosus*. Abplattung. Kein H.-R. *Mucor spinosus* stark gehemmt.
„ „ — „ *Mucor spinosus*. Geringere Abplattung, sonst wie vorige.
Zygorynchus exponens Burgeff gegen *Absidia glauca* Hagem. Submers H.-R., überwuchert mit Luftmyzel.
Mucor mucedo + Brefeld gegen *Mucor hiemalis* Wehmer +. Abplattung. Kein H.-R. *Mucor mucedo* überwächst langsam.
„ „ „ *Mucor spinosus*. Abplattung. *Mucor spinosus* durchwächst langsam.
„ „ „ *Phycomyces nitens* + Kunze. Abplattung von *M. mucedo; Phycomyces nitens* durchwächst kaum gehemmt.
„ „ „ *Phycomyces Blakesleeanus* +. Desgl.
„ *spinosus* „ „ „ *Phycomyces* durchwächst mit schwacher Abplattung.

---

1) Ganz interessant ist im Zusammenhang damit das Verhalten gegen ein kleines noch nicht fertiles *Penicillium*-Myzel. (Oxalsäure, Wehmer [1891, 1913]. *Mucor Bedrchani* ist schon in weiter Entfernung gehemmt. Auf 3 mm zeigen fast alle Hyphen Plasmoptyse, was bei *Phycomyces* und *Mucor spinosus* nicht eintritt [s. auch Ulehla, 1922].)

Mucor Bedrchani gegen *Mucor spinosus*. Schmaler H.-R.
„ „ „ „ *mucedo* +. „ „ „.
„ „ „ „ „ —. Breiterer H.-R.
„ „ „ „ *hiemalis* +. Schmaler H.-R., den *M. hiemalis* langsam durchwächst.
„ „ „ „ *hiemalis* —. Desgl.

Zwischen *Mucor Bedrchani* und *Mucor hiemalis* besteht ein großer Unterschied in der Ausbreitungsgeschwindigkeit. Bei dem viel schneller wachsenden *M. hiemalis* können die Flanken daher weiter überholen, so daß *M. Bedrchani* fast umwachsen wird. Sehr kleine Myzelien werden allgemein von größeren bei Hemmung in ganz typischer Weise umwachsen. Hinter dem kleinen Myzel bleibt ein keilförmiges Stück Agar nach Art eines Schattens unbewachsen, was durch die Diffusionsverhältnisse leicht zu deuten ist (Harder, 1911, Tafel 1, Bild 1).

Einige der Kombinationen, bei denen Durchwachsen eintritt, wurden weiter untersucht.

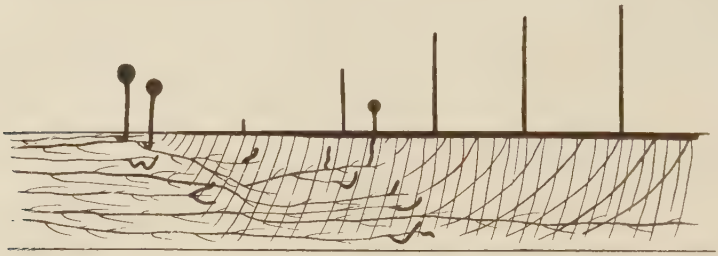

Fig. 15. *Phycomyces Blakesleeanus* + und *Mucor mucedo* +.

1. *Mucor mucedo* + und *Phycomyces Blakeleeanus* + wurden in Petrischalen auf 15 ccm und 3 % Malzagar in 4 cm Abstand geimpft. *M. mucedo* stellt bei Berührung das Wachstum ein. *Phycomyces Blakesleeanus* dringt allmählich mit immer dünner werdenden Hyphen und stark abnehmender Dichte auf 2 % Malz fast 1 cm, auf 3 % Malz noch über die Myzelmitte von *Mucor* hinaus ein. Bei Aufsicht war das an den häufigen Zwergsporangien und selteneren großen Sporangienträgern des *Phycomyces* kenntlich, die aus dem *Mucedo*-Myzel herauswachsen. Hyphenablenkungen kommen beiderseits vor. Das Substrat reagiert sauer. Die Art des Durcheinanderwachsens zeigt sich beim Betrachten des Agarausstichs von der Seite; wie die Querschnittsbilder (Fig. 15) zeigen, wächst *Mucor mucedo* an der Oberfläche und entsendet

fast senkrecht nach unten dünne Hyphen. Es kommen auch submerse Hyphen vor, die von der Oberfläche schräg nach vorn verlaufen. Diese sind am normalen Myzelrand 2—3 mm hinter den Oberflächenhyphen zurück. *Phycomyces Blakesleeanus* wächst auf 2 % Malz ziemlich gleichmäßig verteilt, hauptsächlich im oberen Substratdrittel. Beim Zusammentreffen platten sich beide ab. Die Hyphen in der Nähe der Oberfläche stellen größtenteils das Wachstum ein und bilden Zwergsporangien. Ein Teil aber geht nach unten ins Substrat und unterwächst zusammen mit den anderen submersen Hyphen den *Mucedo*. Sehr häufig stellen Hyphen des *Phycomyces* ihr Wachstum ein und bilden zwischen den senkrecht herabgehenden Hyphen des *Mucedo* Zwergsporangienanlagen. Das *Phycomyces*-Myzel wird so bei weiterem Eindringen immer weniger dicht. Ca. 3 mm von der Hemmungslinie an der Oberfläche entfernt wird beim Aufeinandertreffen mit den flach submers verlaufenden Hyphen des *Mucedo* eine zweite Hemmungslinie gebildet. Auch diese wird noch von *Phycomyces* mit einer nicht sehr großen Anzahl Hyphen durchwachsen. Auf 2, 3 und 6 % Malz wächst *Phycomyces* mit steigender Ernährung immer tiefer ein. Ein Schema für 2 % Malz gibt Fig. 15.

2. *Phycomyces Blakesleeanus* + wächst durch *Mucor spinosus* noch weniger gehemmt als *Mucor mucedo*. Soviel Hyphen durchwachsen, daß anfangs das Fortschreiten des Myzelumfangs im *Mucor spinosus* verfolgbar ist. Eine schwache Abplattung erfolgt vorher bei *Phycomyces Blakesleeanus*. Ablenkungen der Hyphen sind beiderseits vorhanden. Auf 2 % Malz dringt *Phycomyces* bis 1,4 cm ein; er unterwächst nicht nur wie bei *Mucedo*, sondern durchwächst auch. *Mucor spinosus* stellt nach dem Zusammentreffen sein Wachstum ein. Zwergsporangien des *Phycomyces* durchdringen das *spinosus*-Myzel sehr zahlreich. Auf 3 % Malz sind die äußersten 1,5 cm tief im *spinosus*. Die *Phycomyces*-Hyphen dringen viel tiefer, über die Myzelmitte hinaus, ein, werden dort aber schlecht verfolgbar, da die Winkel von Tochter- und Mutterhyphe nun bei beiden Formen gleichsinnig gerichtet sind. Auf 6 % Malz dringen Hyphen durch das ganze Myzel bis zum gegenüberliegenden Schalenrand vor. Die Hyphendichte nimmt nach dem Eindringen schnell ab. In einem Fall wurden Sporen von *Phycomyces Blakesleeanus* und *Mucor spinosus* an eine Stelle geimpft. *Mucor spinosus* keimt viel schneller; sein kleines Myzel wurde dann von *Phycomyces* durchwachsen und mußte sein Wachstum einstellen.

Ich verwandte Böden verschiedener Zusammensetzung, um zu sehen, inwieweit eine Abhängigkeit von der Ernährung bestand. Auf 15 ccm 1proz. Agargallerte mit

1,5 % Glukose,	0,4 % NH_4NO_3,
0,4 „ NH_2HPO_4,	0,2 „ KH_2PO_4,
0,1 % $MgSO_4$	

kommt *Phycomyces* nur sehr schlecht fort[1]). Er macht ein lockeres submerses Myzel, das von dem üppig wachsenden *Mucor spinosus* ohne jede Hemmung überwachsen wurde[2]). *Phycomyces Blakesleeanus* stellt sein Wachstum ein und bildet einige lange Sporangienträger, die das *spinosus*-Myzel durchdringen.

Pepton „Witte" erwies sich für beide Formen als gute Stickstoffquelle. Auf

1,5 % Glukose,	0,2 % KH_2PO_4,
0,5 „ Pepton,	0,1 „ $MgSO_4$

bilden beide Arten dichte Myzelien und fruktifizieren reichlich. Die Linie des Zusammentreffens liegt 2 mm näher bei *Phycomyces*, die Wachstumsgeschwindigkeit ist also fast gleich. *Mucor spinosus* überwächst den *Phycomyces*, der dabei sein Wachstum einstellt, oberflächlich ohne weiteres; submers wird ein schmaler Hemmungsraum gebildet. *Phycomyces* war stark, *Mucor spinosus* nur wenig abgeplattet. Ablenkungen sind vorhanden. Das Substrat blieb sauer.

Aus der Möglichkeit dieser Umkehrung folgt wieder mit größter Wahrscheinlichkeit, daß es nicht besondere Hemmungsstoffe sind, die beim Zusammentreffen die Wachstumseinstellung bedingen. Das gleiche zeigen auch die folgenden Versuche mit *Phycomyces Blakesleeanus* gegen *Saprolegnia Thureti.*

Auf 3 % Malzagar dringt *Phycomyces Blakesleeanus* wie auch *Mucor spinosus* durch Unterwachsen und Durchwachsen — immer dünner werdend — bis über die Mitte des *Saprolegnia*-Myzels vor. In der Aufsicht sind die schwarzen Sporangien im *Saprolegnia*-Luftmyzel bis nahe zur Myzelmitte hin verfolgbar. Ablenkungen sind besonders auf Seiten der *Saprolegnia* deutlich, auf dünnen Böden (Objektträger) auch bei den Mucorineen. Hier wuchs in einem Falle *Saprolegnia* spirotroph (S. 572). An der Seite, wo

---

1) Versuche mit KNO_3 als einziger Stickstoffquelle zeigen, daß er keine Nitrate verarbeitet.

2) *Mucor spinosus* verarbeitet nach Hagem (1910) Nitrate gut.

die zu erwartende Ablenkung mit der Spirotrophie gleichsinnig war, zeigte sich letztere auffallend verstärkt, auf der anderen Seite abgeschwächt. Auf so dünnen Böden dringen von den beiden Mucorineen nur wenige Hyphen ein Stück in das *Saprolegnia*-Myzel ein. *Mucor spinosus* wird stärker gehemmt als *Phycomyces Blakesleeanus* und unterwächst die *Saprolegnia* auf höherem Substrat in der Hauptsache durch submers verlaufende Trägeranlagen, die sich alsdann wieder verzweigen, wieder Trägeranlagen ausbilden usw.

Saprolegnia hat auf dem Glukose-Peptonboden eine größere Wachstumsgeschwindigkeit als *Phycomyces Blakesleeanus*, der beim Zusammentreffen stark gehemmt und überwachsen wird, wobei das Luftmyzel der *Saprolegnia* schnell abnimmt. Die Substrathyphen auf der Oberfläche überwachsen das ganze *Phycomyces*-Myzel. Dieses wächst noch ca. 4 mm weiter und stellt sein Wachstum ein. Nur in einer Kultur drang eine Haupthyphe von *Phycomyces* bis zur *Saprolegnia*-Mitte vor, was durch einen Streifen Zwergsporangien gekennzeichnet war. Es ist denkbar, daß *Phycomyces* sein Wachstum aus O_2-Mangel einstellen mußte, und an jener Stelle eine bessere Luftversorgung stattfand. *Saprolegnia* bildet eine große Menge Schwärmsporangien im unteren Luftmyzel. Die Substratreaktion ist anfangs sauer und geht nach Einstellung des Wachstums in alkalische Reaktion über. An 3 Wochen alten Kulturen tritt schwacher NH_3-Geruch auf.

6. Ergebnis und Literatur.

Wäre Hemmungsraumbildung nur beim Zusammenwachsen der gleichen Rasse aufgetreten, so hätte man an das Vorhandensein von Sterilitäts- oder Oppositionsfaktoren denken können, wie sie Brunswik (1924) für die Rillenbildung bei *Coprinus*-Arten postuliert. Besonders aber die letzten Versuche über das Zusammenwachsen verschiedener Arten und die Möglichkeit, den überwachsenden Pilz zum überwachsenen zu machen, zeigen, daß diese Deutung der Hemmungsräume bei Phycomyceten nicht möglich ist.

Die Bildung des Hemmungsraumes ist keine einheitliche Erscheinung. Sie kann theoretisch durch alle hinreichend stark wirkenden und einseitig angreifenden, wachstumhemmenden Faktoren erzwungen werden. Bei den Mucorineen kommen bei Hemmung im natürlichen Wachstumsverlauf Gleichartigkeit, beim Durch-

wachsen Verschiedenartigkeit der Nahrungsansprüche und Ausnutzungsfähigkeit als Vorbedingung in erster Linie in Frage. Hinreichende Gleichartigkeit kann auch bei systematisch entfernt stehenden Arten gegeben sein. Ein Wechsel des Nährbodens kann hier allerdings Verschiedenheiten herbeiführen.

In zweiter Linie spielt die Bildung von Stoffwechselprodukten in Abhängigkeit von der dargebotenen Nahrung eine Rolle, wobei vor allem Änderung der Wasserstoffionenkonzentration durch Ansäuerung bezw. Alkalisierung in Betracht kommen. Auf Grund dieser Vorbedingungen kann dann ein Hemmungsraum zustande kommen, wobei eine Reihe von Umständen begünstigen, wie vor allem geringe Schichtdicke, geringe Nährstoffmenge und schließlich alle Faktoren, die die Wachstumsgeschwindigkeit herabsetzen bezw. die Diffusion in der Gallerte erleichtern. Bei günstiger Nährstoffkombination, optimaler Nährstoffmenge und Bodenreaktion wird ein Hemmungsraum bei Mucorineen nicht gebildet.

Das Vorhandensein hypothetischer Stoffwechselprodukte und Hemmungsstoffe ist zwar nicht ausgeschlossen, aber zur Deutung der gefundenen Vorgänge unnötig. Es liegt bisher kein Anhaltspunkt für ihre Existenz vor. Ein solcher konnte auch nicht aus der Literatur entnommen werden. Der von Müller (1922) angegebene Hemmungsraum der *Saprolegnia monoica* scheint mir zu denen zu gehören, die auf veränderte Bodenreaktion zurückzuführen sind. Müller gibt Pepton als einzige C- und N-Nahrung. Wie der Geruch von *Saprolegnia*-Kulturen anzeigt, kommt es dabei stets zur Anhäufung freien Ammoniaks (siehe auch Butkewitsch, 1903; Boas, 1919). Da alle Angaben über Bodenreaktion und Geruch fehlen, kann ich seinen Schluß auf Vorhandensein einer „Reizwirkung durch ganz bestimmte Stoffe“ auf Grund der Verbreiterung der Hemmungsgasse mit steigender Ernährung nicht als zwingend ansehen. Harder (1911) sagt bei Ascomyceten und Hymenomyceten in Mischkulturen in Anlehnung an die Arbeiten von Küster (1908) und Lutz (1909): „Es leuchtet ohne weiteres ein, daß die Hemmung des Wachstums der Pilze durch von ihnen ausgeschiedene Stoffwechselprodukte erfolgt.“ Er betont an anderer Stelle ihre unbekannte komplizierte Natur. Zur Frage des Nährstoffmangels wird kein Versuch angeführt, die Substratreaktion nicht in Betracht gezogen. Seine hierher gehörenden Versuche scheinen mir aber mit diesen zwei Faktoren gut deutbar. Die Verhältnisse, die Reinhardt (1892) bei *Peziza* fand, sind nicht

recht vergleichbar: Nur gleiche Arten können sich ungehemmt durchwachsen, wobei Anastomosen häufig sind. Chemomorphosen kommen vor. Es wird Oxalsäure gebildet. Reinhardt nimmt für die Hemmung verschiedener Arten ein Enzym als wirksam an, das von de Bary (1886) für parasitische Pezizaceen gefunden ist. Gegenüber *Mucor* verhält sich *Peziza* wie ein Parasit, indem sie ihn durch osmotische Kräfte aussaugt.

Bei Untersuchungen über den Einfluß von Myzelien aufeinander sind Schlüsse auf spezifische Stoffe fördernder oder hemmender Natur erst dann möglich, wenn der Einfluß veränderter Ernährungsverhältnisse und Bodenreaktion ausgeschaltet ist. Es wäre daher dringend erforderlich, die Untersuchungen der älteren Autoren insbesondere bei Eumyceten zu erweitern, um zu sehen, wo tatsächlich eine Hemmung oder Förderung aus anderen Gründen vorliegt.

Aus den Versuchen von Küster (1908), Lutz (1909) und Harder (1911) über Keimung in gebrauchten Nährlösungen geht die Existenz von solchen besonderen, thermolabilen Stoffwechselprodukten ebenfalls nicht beweisend hervor. So treten z. B. bei Lutz besonders hemmende und fördernde Eigenschaften bei Keimung von *Mucor mucedo* und *Rhizopus* in alten *Saprolegnia*-Nährlösungen mit Pepton als einziger C- und N-Quelle auf. Der Einfluß der alkalischen Reaktion, die Veränderung des NH_3-Gehalts beim Erhitzen, die Förderung in der gebrauchten gegenüber der frischen Nährlösung durch Herabsetzung der schädlich hohen Peptonkonzentration (s. S. 511) sind nicht berücksichtigt worden, waren aber z. T. sicher vorhanden. Auch aus der Arbeit von Nikitinsky (1904) wurde die Wachstumshemmung von *Aspergillus* und *Penicillium* in aufeinanderfolgenden Kulturen bei Verwendung von Peptonlösungen auf den Einfluß der alkalischen Reaktion experimentell zurückgeführt. Hemmungen durch Säureanhäufung konnte derselbe Verfasser durch Verwendung von Puffergemischen aufheben. Er zeigte für *Aspergillus* eine Steigerung des Erntegewichts in gebrauchten Nährlösungen, was durch Reese (1912) bestätigt wurde. Es handelt sich hier aber nicht um thermolabile Stoffe, da zwischen zwei Kulturen jedesmal sterilisiert wurde. Hier seien auch die Untersuchungen von Wehmer (1913) angeführt, der für *Penicillium* eine Selbstvergiftung durch Säureanhäufung nachwies, und ferner die Arbeit von Boas (1919), der dasselbe durch NH_3-Anreicherung bei *Aspergillus* zeigte. Beim Abschluß meiner Unter-

suchungen kam mir die Arbeit von Boyle (1924) in die Hand, in der gleichfalls die Notwendigkeit sorgfältiger Ausschaltung von Unterschieden in der p_H-Konzentration und Ernährung betont wird. Boyle fand bei Berücksichtigung dieser Faktoren bei keimenden *Botrytis*-Sporen auf alter *Fusarium*-Nährlösung (Pflanzendekokte) bleibende Hemmung, die mit der Zusammensetzung des Bodens variierte und durch Abkochen oder Ultrafiltration nur abgeschwächt wurde.

An Keimungsversuchen mit gebrauchter Nährlösung ist von mir selbst nur ein einziger angestellt. In einem Erlenmeyerkolben (750 ccm) impfte ich auf 150 ccm 3proz. Malzlösung *Phycomyces Blakesleeanus* +. Jedesmal, wenn der Kolben voll reifer Sporangienträger war, wurde umgeschüttelt, bis die ganze Decke untergetaucht war. Dann trat neue Pilzvegetation ein. Nach sechs Kulturen wurde 10 ccm 5proz. Malzlösung zugesetzt, da die letzten Kulturen schwächer waren. Nach zwei weiteren Kulturen wurden nochmals 30 ccm 5proz. Malzlösung zugegeben. Das Myzel wuchs danach wieder so üppig, wie bei der ersten Kultur. Nach 4 Wochen weiteren Wachstums (die Kultur war im ganzen 4 Monate alt) wurde durch ein Abflußrohr unten am Erlenmeyerkolben, das vorher mit Schlauch und Quetschhahn verschlossen war, die Flüssigkeit durch ein steriles Papierfilter abfiltriert und auf Jenaer Reagenzgläser verteilt. Der p_H-Wert der gebrauchten Nährlösung war 5,4, kann also auf *Phycomyces* nicht erheblich schädigend wirken. Die eine Hälfte der Reagenzröhren erhitzte ich 15 Minuten lang bei 85° C im Wasserbad. Je ein Sporangium wurde auf die Röhren in 10 bezw. 5 ccm geimpft. Zwischen 10 und 5 ccm war ein Unterschied in der Entwicklung der submersen Myzelflocken deutlich, zwischen roher und erhitzter Nährlösung dagegen nicht. Feinere Unterschiede konnten mir allerdings entgehen. Es wäre nötig, in größerem Umfange Kulturen, deren p_H konstant gehalten ist, nach Ersatz der Nährstoffe auf ihren Einfluß zu prüfen und dann nach toxischen Stoffen zu suchen. Dabei wäre auch mit möglichst günstigen und ausbalanzierten Substratzusammensetzungen zu arbeiten.

Abschnitt IV.

Das Wachstum der Hyphen im Myzel.

Es muß notwendigerweise angenommen werden, daß die verschiedenen Individuen eines Myzels, das aus einem Sporenklumpen

hervorgeht, aufeinander mit denselben Faktoren einwirken, wie das zwei aufeinander zuwachsende Individuen tun; d. h. aber, daß die Wachstumseinstellung von Hyphen in einem solchen zusammengesetzten Myzel auf denselben Ursachen beruht wie die Wachstumseinstellung im Hemmungsraum; und weiter muß in einem Einspormyzel, da die Anordnung die gleiche ist, auch in diesem über Auswachsen bezw. Nichtauswachsen von Hyphen nach denselben Prinzipien entschieden werden. Ganz folgerichtig nimmt auch Müller Stoffwechselprodukte als entscheidende Ursache für Wachstumsvorgänge im Myzelinnern an; so z. B. auf das Auswachsen von Seitenhyphen zu Randhyphen einen fördernden und wachstumsanregenden Einfluß. Wenn eine Seitenhyphe auswächst und zur Rand- und Haupthyphe wird, muß sie den bei ihrer Anlage bestehenden Abstand vom Myzelrand einholen. Dieser Umstand ist nach Müller dadurch erklärbar, „daß die Stoffwechselprodukte auf die neu gebildete Tochterhyphe einen Reiz ausüben, der bei einem Teil derselben eine Wachstumsbeschleunigung hervorruft".

Um zu entscheiden, wann eine Hyphe auswächst bezw. ihr Wachstum einstellt, verfolgte ich mit einem Abbeschen Zeichenapparat den Hyphenverlauf am Myzelrand in regelmäßigen Zeitabständen. *Phycomyces Blakesleeanus* wuchs dabei in feuchten Kammern auf Deckgläsern, die mit einer dünnen Agarschicht überzogen waren. Ein Übereinanderwachsen der Hyphen kam dabei nicht vor (Fig. 16*a*--*d*). Das Resultat zahlreicher Beobachtungen läßt sich dahin zusammenfassen, daß in einem Myzel eine Hyphe dann nicht mehr auswächst und zur Randhyphe wird, wenn ihre Spitze hinter der Verbindungslinie der zwei rechts und links nächst benachbarten wachsenden Hyphenspitzen zurückbleibt. Bei geringer Schichtdicke — wie im vorliegenden Fall — stellt sie das Wachstum dann sehr bald ein; bei größerer Substrathöhe kann sie noch weiter auswachsen, wie auch später noch jede Hyphe im Myzelinnern auf Grund erneuter Nährstoffzufuhr. Das zeigt sich z. B. nach Aufstreuen fester Malzteilchen, nach Abtöten einiger Hyphen und bei Böden mit so großer Nährstoffmenge, daß diese beim Durchwachsen nicht ausgenutzt wird. In Myzelhäuten auf 25 % Malzagar treten nach einiger Zeit durch solche sekundäre Einschaltung von Langhyphen von der Mitte nach außen fortschreitend Falten auf. Randhyphen können diese verspätet auswachsenden Hyphen nicht mehr werden; das können nur solche, die den geringen Ab-

stand vom Myzelrand bei ihrer Anlage weiterhin zu behaupten und noch zu verkleinern vermögen.

Legt man ferner auf ein Myzel eine Glimmerplatte auf, so wachsen — nach dem Absterben der bedeckten Hyphen — von

Fig. 16.

dem Rand der Platte aus Hyphen in dichter Zahl unter die Glimmerplatte — soweit die Sauerstoffversorgung das gestattet — und senkrecht ins alte Myzel ein, so daß um die Glimmerplatte ein dichter Hof von Myzel gebildet wird. Auch ein anderer Versuch ist hier anzuführen, bei dem noch nicht fertile Einspormyzelien

von ca. 3 cm Durchmesser durch 30 Minuten langen Aufenthalt im Thermostaten bei 55° C abgetötet wurden. An einigen Punkten blieb das Myzel noch wachstumsfähig. Von hier aus breitete sich ein Myzel fast kreisförmig aus. Die alten Hyphen wurden mit einer nur etwas geringeren Wachstumsgeschwindigkeit durchwachsen, wohl weil ein Teil der Nährstoffe unverwertbar festgelegt war.

Nach alledem scheint mir das Auswachsen und Nichtauswachsen viel ungezwungener auf Grund von Ernährungsverhältnissen erklärbar, als durch einen hemmenden oder gar fördernden Reiz von Stoffwechselprodukten, der auch nur auf einen Teil der Hyphen wirken dürfte. Daß die Wachstumseinstellung im Myzel auf dieselben Ursachen wie die Hemmungsraumbildung zurückzuführen ist, nämlich hier auf Nährstoffmangel, zeigen die weitgehenden Analogien: Breiterwerden des Hemmungsraumes und geringere Dichte bei schlechter Ernährung, kein Hemmungsraum und feste Substrathaut bei guter Ernährung; bei Aufstreuen von Malz Auswachsen im Hemmungsraum und im Myzel.

Wie ist es nun aber möglich, daß die Seitenhyphen, die zu Randhyphen werden, nicht nur ihren alten Abstand von der Spitze der Mutterhyphe beibehalten, sondern aufholen und den Rand erreichen?

Mir fiel beim Messen der Verzweigungsdichte auf, daß die ersten Verzweigungen der Langhyphen weiter voneinander entfernt waren, als die der Mutterhyphe im entsprechenden Abschnitt. Messungen ergaben dann, daß die Haupthyphen nach Anlage einer Seitenverzweigung früher eine zweite ausbilden als diese Tochterhyphe. Es wurden aus 20 Messungen mit Okularmikrometer Ok. 4 Obj. 3 Leitz die Durchschnittswerte berechnet. Sie waren für den Abstand von der gemeinsamen Abzweigstelle bis zur ersten Seitenhyphe bei der Tochterlanghyphe 13,1, bei der Mutterhyphe 5,7 Skalenteile. Es wurde außerdem an einer willkürlich herausgegriffenen Haupthyphe von der Myzelmitte bis zum Rand dieser Abstand für die Mutterhyphe und sämtliche von ihr abgehenden Langhyphen gemessen. Für den Abstand von der gemeinsamen Abzweigstelle bis zur zweiten Verzweigung ergaben sich für die Seitenhyphen 21,2, für die Mutterhyphe 12,2 Skalenteile. Nun läßt aber das Wachstum einer Hyphe bei Bildung eines Seitenzweiges vorübergehend erheblich nach (Müller, Trzebinski, 1902). Diese Verzweigungsverzögerung tritt bei der Mutterhyphe

also anfangs viel häufiger auf als bei der Tochterhyphe, die so ein Stück aufholen wird.

Die Beobachtung, die Müller als Stütze für seine Annahme fördernder Stoffwechselprodukte heranzieht, machte ich auch bei *Phycomyces:* Der Keimschlauch einer isolierten Spore bleibt hinter dem einer Spore im Sporenklumpen an Länge zurück. Müller meint, daß das nur durch stimulierende Wirkung von ausgeschiedenen Stoffen herbeigeführt sein könne. Ich möchte zur Deutung folgende Hypothese aufstellen: Beim Vergleichen fällt auf, daß das junge Keimmyzel der Einsporkultur ganz mit dichtem Plasma erfüllt ist, während beim Sporenklumpen die Keimschläuche einen wenig dichten Inhalt mit zahlreichen Vakuolen besitzen. Ebenfalls ist im ersten Fall der Durchmesser der Hyphe größer, und es findet an zahlreichen Vegetationspunkten Wachstum statt, während im anderen Fall die dicht gedrängten Keimhyphen nur an einem Punkt, der Spitze, wachsen. Wie aus den Versuchen über den Hemmungsraum hervorgeht, verarmt bereits bei den gebräuchlichen Konzentrationen das Substrat beim Überwachsen völlig an dem Stoff, der im Verhältnis zum Verbrauch in geringster Menge da ist. Das Durchwachsen nach Aufgabe von Ammoniumsalzen zeigte, daß dies bei Hemmung auf Malzböden beim Stickstoff der Fall ist, während Kohlenstoff reichlich zur Verfügung steht. Aufbau organischer Substanz kann aber nur dort erfolgen, wo beides vorhanden ist. Das Keimmyzel einer isolierten Spore kann anfangs an seiner ganzen Oberfläche C- und N-Nahrung aufnehmen, ist dicht mit Pllasma erfüllt und vakuolenfrei. Die Hyphen im Sporenklumpen nehmen nur an der Spitze Stickstoffsubstanzen auf, Kohlenstoff — Monosaccharide hier im besonderen — an der ganzen Oberfläche. Es wird wenig Plasma gebildet, dagegen viel Zucker aufgenommen, der osmotisch wirksam wird. Wie Trzebinski gezeigt hat, sind für Wachstumsschwankungen besonders Turgorschwankungen verantwortlich zu machen. Werden also viel Kristalloide aufgenommen, so muß der osmotische Wert um so rascher ansteigen und um so weniger aus N-Mangel zur Bildung von Plasma verwandt werden. Nimmt man nun an, daß die Membran dort, wo Plasma aufgebaut wird, im besonderen Maße wachstumsfähig und dehnbar ist, so muß im Sporenklumpen bei zunehmendem Turgor zuerst stets die Membran an der Spitze nachgeben; sie wird stark gedehnt und ihr Intussuszeptionswachstum gesteigert werden. Bei dem Einspormyzel wirkt im wesentlichen der Quellungsdruck des

Plasmas dehnend. Da hier an der ganzen Oberfläche — wenngleich nicht überall in gleichem Maß — N und C aufgenommen und Plasma gebildet wird, werden die Unterschiede in der Membrandehnbarkeit nicht erheblich sein. Hier gibt die Membran in ihrer ganzen Oberfläche bei zunehmendem Turgor nach. Viele Seitenhyphen wachsen aus, und der Hyphendurchmesser steigt. Diese verschiedenen Verhältnisse könnten die Unterschiede der Keimmyzelien ohne die Annahme von fördernden Stoffwechselprodukten verständlich machen.

Am Myzelrand sind die Verhältnisse ähnlich deutbar: Die Spitzen der Haupthyphen und der auswachsenden Tochterhyphen sind in ihrer Ernährung ziemlich gleichgestellt; sie haben beide freien Nährboden vor sich und wachsen ziemlich gleich schnell. Bei den Abschnitten hinter der Spitze ist aber anfangs die Stoffaufnahme verschieden. Bei der Haupthyphe ist die Dichte hier eben so gering, daß die Einschaltung neuer Randhyphen nötig wird. Es wird hier mehr N-Substanz aufgenommen, mehr Plasma gebildet und es werden, da die Membran dehnbarer und wachstumsfähiger ist, mehr Seitenzweige angelegt als bei der Tochterhyphe.

Eine häufige Beobachtung sei angeführt, die zeigt, daß das Spitzenwachstum der Mucorineen in anderer Weise erfolgt, als das von Reinhardt (1892) für *Peziza* angegeben wird. Wachsen Hyphen von *Phycomyces Blakesleeanus* von Agar auf trockene Glimmerplatten, Zelloidinmembranen oder Glas herunter, so beschreiben sie unter ziemlich scharfen Windungen eine breite Wellenlinie. Jedesmal an der konvexen Seite eines Wendepunkts entsteht eine Seitenhyphe. Wachsen solche Hyphen in einen aufgesetzten Wassertropfen hinein, so wird ihr Wachstum normal. Diese Wellenlinie ist als eine „Schraube in der Ebene“ aufzufassen. Hier zeigt sich die normale Art des Hyphenverlaufs im Agar nur in — vielleicht durch Reibung auf der Unterlage — besonders stark gesteigerter Form. In nicht sehr nährstoffreichen Böden und Lösungen zeigt sich sehr auffallend, daß die Hyphen nicht geradlinig verlaufen, sondern in Form einer mehr oder weniger langausgezogenen Spirale. Dies wäre durch Annahme einer exzentrisch gelegenen Zone intensivsten Membranwachstums, die um die Spitze kreist, erklärbar. Interkalares Wachstum mit Reibung der Spitze an der Unterlage genügt nicht zur Deutung, da Hyphenspitzen in allen Stadien des Umbiegens beobachtet wurden. Es sei hier auch auf das spiralige Wachstum bei den

Kröpfen des *Phycomyces* var. *piloboloides* hingewiesen (Burgeff, 1915 II).

Konvexe Stellen sind bei der Anlage von Seitenhyphen stark bevorzugt. Sie sind zugleich gegenüber den konkaven Stellen bei der Zudiffusion von Nährstoffen (wie auch bei der Abdiffusion von Stoffwechselprodukten) begünstigt. Auf gleich große Stücke Hyphenoberfläche entfällt auf der konvexen Seite ein viel größeres Volumen des Nährbodens als auf der konkaven.

Abschnitt V.

Der Chemotropismus.

1. Die gegenseitige Ablenkung der Hyphen.

Daß bei den Phycomyceten chemotropische Krümmung überhaupt vorkommt, zeigt am besten die Ablenkung der Hyphen beim Zusammentreffen, wie sie besonders am Hemmungsraum in einiger Entfernung von der Mitte zu sehen ist. Beobachtungen an *Phycomyces Blakesleeanus*, *Ph. nitens*, *Mucor spinosus*, *M. mucedo*, *M. hiemalis* und *Saprolegnia Thuretii* zeigen, daß bei Phycomyceten diese chemotropische Reaktion eine allgemeine Erscheinung ist. Müller beobachtete sie an kreisförmig aufeinander zuwachsenden Saprolegnien. Nach ihm liegt das Maximum der Ablenkung dort, wo die Radien der gegeneinander wachsenden Myzelien senkrecht aufeinander stehen, die Hyphen also einen Winkel von 90° miteinander einschließen. Ob diese chemotropische Reaktion eine positive auf Nährstoffe oder, wie Müller meint, eine negative auf Stoffwechselprodukte ist, läßt sich von vornherein nicht entscheiden.

Um quantitative Angaben über diese Ablenkungen zu erhalten, ging ich nicht von kreisförmig sich ausbreitenden Myzelien aus, sondern zog unter bestimmten Winkeln Impfstriche in Drigalskischalen auf ungefähr 2 mm hohe Agarböden mit 3 % Malz. Verwandt wurden Sporen von *Phycomyces Blakesleeanus*. Nach dem Zusammentreffen wurde mit einem auf Glas eingeritzten Winkelmesser eine Strecke ausgesucht, bei der die Hyphen unter gleichem Winkel aufeinander trafen, und hier an den Haupthyphen die Ablenkung mit Ok. 1 Obj. 3 Leitz festgestellt. Die Resultate gibt Tabelle 16. In der obersten Reihe sind die Winkel angegeben, den die nicht abgelenkten Hyphen miteinander einschließen, in der zweiten die Zahl der Haupthyphen auf der gemessenen Strecke.

In den nächsten Reihen findet sich das Resultat in Prozentzahlen, wobei + eine Hinkrümmung zum Schnittpunkt der Impfstriche, — eine schwache, —— eine starke Abbiegung bedeutet. Bei 180° wurde willkürlich eine Seite als + angenommen. Die Summe der Abbiegungen findet sich in der letzten Zeile. 0 = indifferentes Verhalten bedeutet Wachstumseinstellung ohne Krümmung.

Tabelle 16.

Winkelgrade . .	30 bis 40°	50 bis 60°	60 bis 75°	80 bis 100°	110 bis 115°	120 bis 140°	140 bis 160°	160 bis 170°	180°
Zahl der Messungen .	58	287	235	333	215	415	335	133	59
+ in % . . .	0	0,6	1,9	2,9	9,3	8,1	7,0	6,0	16,9
0 in % . . .	26,0	30,9	26,7	37,7	36,2	55,8	60,3	72,2	64,4
— in % . . .	38,7	23,7	21,7	24,3	19,4	19,4	20,8	15,7	17,0
—— in % . .	35,3	44,8	49,7	35,1	35,1	16,7	11,9	6,1	1,7
Sa. in % . . .	74,0	68,5	71,4	59,4	54,5	36,1	32,7	21,8	18,7

Ein ziemlich hoher Prozentsatz zeigt schon bei 180° Ablenkung. Das ist durch Ungleichmäßigkeiten am Myzelrand verursacht. Die Zahl der abgelenkten Hyphen steigt dann ständig mit kleiner werdendem Winkel an. Die Größe des Ablenkungswinkels ist bei stumpfem Winkel am größten, Ablenkungen kommen dort aber selten vor, da hier meist während oder vor der Krümmung das Wachstum eingestellt wird. Diese Wachstumseinstellung erfolgt, wie bei der Hemmungsraumfrage gezeigt ist, auf Grund von Nährstoffmangel. Müller nimmt für Hemmung und Ablenkung dieselben Stoffe als Ursache an, wofür jedoch kein zwingender Grund vorliegt. Selbst auf hoher Malzkonzentration waren keine Hemmungsstoffe nachweisbar, eine Ablenkung erfolgte dort gleichfalls. Daraus folgt, daß diese Ablenkungen entweder positiv sind oder negativ auf Stoffwechselprodukte, die bei der Wachstumshemmung nicht entscheidend beteiligt sind.

Die Seltenheit großer Ablenkungswinkel beim Aufeinandertreffen unter stumpfen Winkeln beruht darauf, daß hier der Hyphe, noch ehe sie eine Krümmung voll ausführen kann, der Weg abgeschnitten wird. Es wirkt nicht nur das gegenüberliegende Myzel auf die Hyphen ein, sondern in gleicher Weise auch die Nachbarhyphen. Krümmung kann nur eintreten, wenn der Reiz einseitig

stärker erfolgt; dies ist aber nur so lange der Fall, als die benachbarten distalen Hyphen sich noch nicht erreicht haben. Später wird eine einseitig hinreichend starke Zudiffusion von Nährstoffen oder Abdiffusion von Stoffwechselprodukten unmöglich (s. S. 578). Diese benachbarten Hyphen treffen sich bei dem Zusammentreffen unter spitzen Winkeln aber viel später als unter stumpfen Winkeln.

Die Ablenkung ist ungefähr bei 70° am auffallendsten. Bei kleineren Winkeln braucht bis zur Parallelstellung nur eine schwache Krümmung ausgeführt zu werden. Sie krümmen sich hier meist etwas übereinander, so daß bei Aufsicht eine „Falte" im Myzel erscheint. Die Messungen wurden bei kleinerem Winkel als 30° unmöglich.

2. Chemotropismus und Anisotrophie.

Müller stützt seine Ansicht, daß diese Krümmungen negative auf Stoffwechselprodukte seien, im wesentlichsten indirekt durch den nicht gelungenen Nachweis eines positiven Chemotropismus.

Fig. 17.

Die zweite stützende Annahme, daß Wachstumseinstellung und Ablenkung gleiche Ursachen hätten, die Einstellung aber nicht durch Nährstoffmangel bedingt sein könne, hat sich bereits als nicht zutreffend erwiesen.

Es wurde mit Anordnungen, die denen Müllers ähnlich waren, die Frage des positiven Chemotropismus weiter untersucht. Agarklötzchen mit hohem Nährstoffgehalt bezw. mit einem aufgelegten Kristall auf einer Zelloidinmembran, die das Einwachsen verhindern sollte, wurden vor den Rand eines Myzels gesetzt. Das typische Bild der Reaktion, z. B. auf Malz- oder Peptonagar, war für *Phycomyces Blakesleeanus*, *Mucor spinosus*, *M. muci-*

lagineus und *Thamnidium elegans* folgendes: Die Hyphen, die gerade auf den Block zuwachsen, lösen sich nach reichlicher Verzweigung in dünne Hyphen auf. Vor dem Block bilden sie einen dichten, makroskopisch sichtbaren Wall. Unter dem Block wachsen aus Sauerstoffmangel nur wenige dünne Hyphen durch. Die seitlich verlaufenden Hyphen reagieren seltener durch Zukrümmung, fast stets aber durch Anisotrophie, wie das schon für den Aërotropismus dargelegt ist. Chemotropische Zukrümmung war noch am häufigsten hinter dem Klotz, wo durch den Ausfall der direkt auf den Block zugewachsenen Hyphen eine Lücke entstanden war. Solche Zukrümmungen auf einen Agarklotz mit KH_2PO_4 zeigt Fig. 17. Die Klötzchen waren 2—5 mm vor dem Myzel aufgestellt. 1,5 cm, wie Müller angibt, ist zu weit, da dann die Vorbedingung eines hinreichenden Diffusionsgefälles beim Herankommen der Hyphen nicht mehr erfüllt sein kann.

Fig. 18.

Es wäre denkbar, daß deutliche Zukrümmungen darum so zurücktreten, weil ein entgegengesetzt ablenkender Faktor — z. B. Stoffwechselprodukte — wirksam ist. Es wurde daher auf verschiedene Weise versucht, den Einfluß der Nachbarhyphen auszuschalten. Der Rand der Zelloidinmembran wurde vor dem Myzel etwas in den Agar eingedrückt, so daß einige Hyphen auf die Membran *(M)* hinauf wuchsen. Zukrümmungen dieser Hyphen waren häufiger (Fig. 18 auf Peptonagar). Da aber um den Agarklotz sich stets Flüssigkeit ansammelt, kam auch Hydrotropismus (Fulton, 1906) in Frage. Danach arbeitete ich mit Hungermyzelien auf Stärkeböden geringen Gehalts (mit Druck sterilisiert), so daß angesichts der nicht radiären Einstellung kein Einfluß der Nachbarhyphen zu erwarten war. Anisotrophie herrschte als Reaktionsform vor. Einwandfreie Zukrümmungen zu einem Agarklotz mit 7 % Malz zeigt Fig. 19. Die Agarklötze wurden von den Hyphen

durch Tropismus oder Anisotrophie erreicht und wurden dann zum Mittelpunkt eines strahlig sich von hier aus ausbreitenden Myzels, das beim Nachlassen der Nährstoffzufuhr bald wieder in ein Hungermyzel überging.

Fig. 19.

Zukrümmungen sind bei dieser Anordnung wohl einwandfrei vorhanden, aber das Überwiegen der anisotrophen Reaktion macht ein genaues Studium ganz unmöglich. Es wurde daher die zweite Versuchsanordnung Müllers in modifizierter Form verwandt. Auf Pepton- und Malzagarböden wurde eine Glimmerplatte 4×3 cm gelegt, in die mit einer spitzen Nadel Löcher im Abstand von 1 cm eingestochen waren. Auf diese Platte kam eine Zelloidinmembran, darauf ein Impfklotz. Die Glimmerpatte wurde erst dann aufgelegt, wenn das Myzel die ersten Löcher nahezu erreicht hatte.

Fig. 20.

Das Ergebnis war ganz ähnlich: Ein Teil der Hyphen erreichte durch Zukrümmungen, der größere durch Anisotrophie die Löcher.

Hier setzte starke Verzweigung ein, die zur Bildung eines buckelartigen Hyphenknäuels über dem Loch führte, das bei guter Ernährung mehrere Millimeter hoch werden konnte. Auf die Entstehungsbedingungen wird später noch zurückzukommen sein. Es ist gleichgültig, ob sich auf der Membran noch eine dünne Agarschicht befindet oder nicht. Für *Saprolegnia* zeigt Fig. 20 eine Reaktion mit verhältnismäßig vielen Zukrümmungen zu einem Loch, über dem ein Buckel (Umrisse mit gebrochener Linie) gebildet wurde. Der Agarboden enthielt 1,5 % Malz und 0,5 % Pepton.

3. Kritik an den Versuchen und der Literatur.

Diese zweifellos vorhandenen Zukrümmungen können aber nicht als Beweis für einen positiven Chemotropismus angesehen werden, da bei diesen Anordnungen gleichsinnig mit der Zudiffusion der Nährstoffe eine Abdiffusion von Stoffwechselprodukten vor sich gehen muß. Solange das Vorhandensein eines negativen Chemotropismus diesen gegenüber behauptet wird, sind die Anordnungen für den Nachweis positiv chemotropischer Reaktion ungeeignet. Das gilt auch bei den im Prinzip gleichen Versuchen Miyoshis (1894) und Fultons (1906) mit Epidermis, durchlochten Kollodiumhäutchen und Glimmerplatten sowohl für Myzelhyphen als auch für Keimhyphen, ferner bei sämtlichen Versuchsanordnungen E. W. Schmidts (1908) und gleichfalls für die Versuche Müllers, die er als Beweis für einen positiven Chemotropismus bei Keimhyphen ansieht. Diese Kritik trifft auch die Angabe Reinhardts (1892), der Zukrümmungen von *Peziza* auf frisch zugesetzte Nährgelatine bekam. Die Tatsache, daß Müller bei seinen Versuchen keine Zukrümmungen erhielt, zeigt dagegen aufs deutlichste, wie schwer die Reaktionsform durch Förderung der entsprechend gerichteten Seitenhyphen, durch Anisotrophie, selbst dort die Feststellung chemotropischer Krümmungen macht, wo die Möglichkeit dazu zweifellos vorhanden ist. Über die Ursache der Zukrümmungen läßt sich also nach diesen Versuchen nichts aussagen. Eine Anordnung, bei der dieses Parallelgehen von Zu- und Abdiffusion nicht stört, ist die Kapillarmethode. Hier wird bei geeignetem Einstechen kein neuer Raum zur Abdiffusion von Stoffwechselprodukten zur Verfügung gestellt. Es könnte bei einem Myzel negativ chemotropische Reaktion zur Kapillare höchstens dann stattfinden, wenn der Aggregatzustand und damit die

Diffusionsverhältnisse in ihrem Inhalt andere sind. Dieser Unterschied kann für Kolloide zwischen Agarböden und wässeriger Lösung ins Gewicht fallen. Eine große Schwierigkeit besteht bei der Kapillarmethode in dem Konstanterhalten eines steilen Diffusionsgefälles. Die Möglichkeit eines zu schnellen Ausgleichs ist bei gewöhnlichen Kapillaren in so hohem Maße vorhanden, daß fehlende Krümmungen nicht als Beweis gegen einen positiven Chemotropismus gelten können. Ich benutzte trichterförmige Kapillaren, die nur ganz kurz ausgezogen waren. Auch hier war die Reaktion anisotroph.

Der Versuch Clarks (1902), der bei Keimhyphen von *Rhizopus* Zukrümmungen auf Wasser erhielt, kann als Beweis für negativen Chemotropismus nicht gelten. Es war hier zweifelsohne während der Keimung längst ein Ausgleich im Nährstoffgehalt eingetreten und die Herandiffusion von Nährstoffen aus der sporenfreien Kapillare stärker als aus dem reichlich mit verbrauchenden Keimschläuchen versehenen Agar. Miyoshi (1894) führt dagegen einen Kapillarversuch mit *Saprolegnia* an, bei dem aus Zeichnung und Text positive Krümmung auf 2 % Fleischextrakt einwandfrei hervorgeht. Das Resultat scheint allerdings vereinzelt. „Lokale Vermehrung“ — also Anisotrophie — wurde als sehr störend empfunden. Es ist die Verwendung der Kapillarmethode, wie Miyoshi schon angibt, für Chemotaxis frei beweglicher Organismen gut, für wachsende Organe aber nur sehr bedingt brauchbar. Das zeigt auch die Unsicherheit der Resultate Fultons mit Kapillarversuchen.

Im Gegensatz zu Wortmann (1887) und Miyoshi (1894) fanden Clark (1902) und Fulton (1906) keinen positiven Chemotropismus, nahmen dagegen einen negativen auf eigene Stoffwechselprodukte an. Von den Versuchen, die als Beweis aufgeführt werden, ist einer von Clark bereits besprochen. Bei den anderen Versuchen befanden sich beiderseits einer durchlochten Glimmerplatte dünne Agarschichten, von denen eine mit Sporen besät war. Es fand nun ein Hinwachsen zu den Löchern statt, auch wenn auf der anderen Seite reiner Agar war. Da *Rhizopus*, wie auch andere Arten, auf reinem Agar wachsen kann, so kann dieses Medium nicht als nährstofffrei angesehen werden. Dazu kommt ein Ausgleich durch Diffusion während der Keimzeit (eingehendere Begründung s. S. 576—578).

Es ist außerdem bei den Untersuchungen über den Chemotropismus bei Keimschläuchen nie zwischen Tropismus und Wachs-

tumsförderung entsprechend gerichteter Organe (Anisotrophie) unterschieden. Die ungekrümmten Keimschläuche, die an der zugewandten Seite auswuchsen, wurden mitgezählt, obwohl dies als tropische Reaktion nicht anzusprechen ist.

Das trifft auch für die Arbeit von Graves (1916) zu, der zum ersten Male durch seine Anordnung positiven und negativen Chemotropismus trennte. Er arbeitete ebenfalls mit zwei dünnen, durch eine durchlochte Glimmerplatte getrennten Agarschichten. Er verwandte dabei nun verschiedene Kombinationen, z. B.

1) $\frac{\text{Rübensaftagar mit Sporen}}{\text{Rübensaftagar mit Sporen}'}$ 2) $\frac{\text{Rübensaftagar}}{\text{Reiner Agar mit Sporen}'}$

3) $\frac{\text{Rübensaftagar}}{\text{Rübensaftagar} + \text{Sporen}'}$ 4) $\frac{\text{Reiner Agar}}{\text{Rübensaftagar} + \text{Sporen}'}$

5) $\frac{\text{Rübensaftagar mit Sporen}}{\text{Reiner Agar mit Sporen}}$.

Bei gleichen Sporenmengen erfolgte in Fall 1) keine Krümmung, da beiderseits gleiche Bedingungen herrschten. In Fall 2) wirkt positiver und negativer Chemotropismus gleichsinnig. Die Zukrümmungen waren maximal. Bei 3) war das Nährstoffgefälle schwächer. Auch hier fanden sich starke Zukrümmungen. In Fall 4) wirkte nach Graves positiver und negativer Chemotropismus entgegengesetzt. Bei einer großen Zahl von Keimschläuchen wird aber m. E. die untere Schicht sehr schnell nährstoffarm, während die obere durch Zudiffundieren während der Keimzeit angereichert wird. Graves gibt an, daß die Reaktion — Zukrümmung — mit dem Alter stark zunimmt. Das ist sowohl durch stärkere Stoffwechselproduktausscheidung, als auch durch stärkere Erschöpfung der unteren Schicht und stärkere Anreicherung der oberen erklärbar. In Fall 5) wirkt nur positiver Chemotropismus. In bezug auf die Abdiffusion der Stoffwechselprodukte sind beide Schichten gleichgestellt. Hier krümmen sich die Keimschläuche einerseits von dem reinen Agar mit Sporen ab, andererseits zu dem Rübensaftagar hin. Dies letzte Resultat beweist das Vorhandensein eines positiven Chemotropismus, ebenso die stärkeren Zukrümmungen in 2) gegenüber 3). Die Ansicht negativ-chemotropischer Wirkung der „Altersstoffe“ stützt Graves durch Versuche mit gebrauchtem Rübensaft, auf den vor dem Kochen die Schläuche negativ, nachher positiv reagieren. Die Resultate zeigen — sofern sich auch bei Berücksichtigung der Anisotrophie das gleiche Verhalten fest-

stellen läßt —, daß Keimschläuche negativ-chemotropisch reagieren können; sie zeigen auch, daß die Möglichkeit eines Vorhandenseins thermolabiler „Altersstoffe“ besteht. Beweisend sind sie nicht, da auch hier zutrifft, was bei Besprechung der Arbeiten über Hemmungsstoffe oben gesagt wurde (S. 553).

4. Versuche zur Unterscheidung des positiven und negativen Chemotropismus.

Ich versuchte nun für Myzelhyphen chemotropische Krümmungen mit Unterscheidbarkeit ihrer positiven oder negativen Natur zu erzielen. Die Anordnung Graves kommt dabei für Myzelhyphen nicht in Betracht.

1. Ein Weg bestand in einer Abänderung der Kapillarmethode. Auf eine plane Glasplatte wurde aus vier Längshälften von Objektträgern (76 mm) ein Rahmen aufgekittet. In 2 cm Abstand von einer Ecke dieses Rahmens wurden zwei gleich hohe Glasstreifen von 2,5 cm Länge so eingekittet[1]), daß sie diese Ecke abtrennten, aber vorn noch einem Glasrohr Austritt ließen. Dieses Rohr hatte eine 1 mm breite, dünnwandige Mündung. Fig. 21 zeigt die Anordnung im Grundriß.

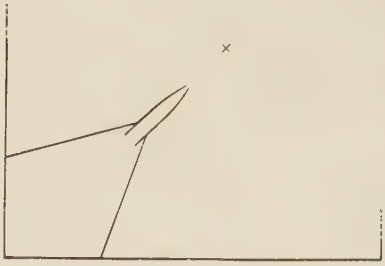

Fig. 21.

In den Rahmen wurde ein Nährboden mäßiger Konzentration eingegeben, in die Ecke ein gleicher mit dem Chemotropikum. Die submerse Rohrmündung war so Zentrum für einen sehr lange konstanten Diffusionsstrom. Der Diffusionsweg wurde hier wie in allen Versuchsanordnungen zuerst mit Eosin verfolgt. *Phycomyces Blakesleeanus* wurde in 0,75—1,5 cm Entfernung aufgeimpft. Die Reaktion auf 10 % Malz war stark positiv anisotroph ohne einwandfreie Zukrümmungen.

2. In einen gleichen Rahmen wurde ein 2 cm breiter Streifen in der Mitte durch zwei mit Gummilösung eingeklebte Glasstreifen

1) Als Kitt verwandte ich anfangs einen käuflichen Kitt, der große Mengen $CaCO_3$ enthielt, später einen Kitt aus 2 Teilen Glaspulver, 3 Teilen Flußspatmehl und 5 Teilen Wasserglas. Beide Kitte gaben Alkalien ab, was durch Bestreichen mit einer Gummilösung, die keinen Einfluß ausübt, ausgeschaltet wurde, wie Prüfung mit Neutralrot ergab.

abgetrennt. In diesen Streifen kam Agar niederer Nährstoffkonzentration, in dem das Myzel wuchs. Wenn dieses eine gewisse Größe erreicht hatte, wurden die beiden Glasstreifen herausgenommen und rechts und links Lösungen eingegossen, auf die eine Seite eine Lösung von dem Gehalt des Agarstreifens, auf die andere Seite eine mit 5 bezw. 10 % Malz. Fig. 22 gibt die Anordnung im Querschnitt.

Phycomyces Blakesleeanus reagiert in allen Fällen sehr stark positiv anisotroph, Krümmungen waren auch hier vorhanden, wenngleich nicht eindeutig und beweisend. Das gleiche tritt ein, wenn zur Herabsetzung osmotischer Differenzen dem Agar des Streifens und der gleichen Lösung 3 % Saccharose — die *Phycomyces* nicht verarbeitet — zugesetzt war. Mit einer ähnlichen Anordnung waren vorher Diffusionsgeschwindigkeiten zum Vergleich gemessen worden. In 1 % Agar diffundierten aus wässeriger Lösung

0,1 % Eosin in 24 Stunden . . . 16 mm,
0,5 „ „ „ 24 „ . . . 20 „ ,
0,1 „ Kongorot in 24 Stunden . . 5 „ ,
0,5 „ „ „ 24 „ . . 6 „ .

Fig. 22.

Die Umfärbung eines Neutralrot-Agars schreitet bei Eindiffusion von 0,46 % K_2CO_3 in 2 Stunden 8 mm,
„ 5 „ 13 „ ,
„ 15 „ 23 „ ,
„ 20 „ 27 „ fort.

3. Ein gleicher quadratischer Kasten (76 : 76 mm) wurde durch einen 6 mm hohen eingekitteten Glasstreifen in zwei Hälften geteilt. Auf diesen Streifen klebte ich mit Gummilösung eine Glimmerplatte auf (45 : 35 mm), die in bestimmter Anordnung durchlocht war. Zwei Systeme von je vier längsgerichteten Lochreihen waren zueinander symmetrisch so eingestochen, daß zwischen ihnen über dem halbierenden Glasstreifen eine Gasse von 4—5 mm Breite undurchlocht blieb. Der Abstand von Loch zu Loch betrug 1 mm. Die erste Reihe war an der Stelle, an der der Impfklotz aufgesetzt wurde, 5 mm unterbrochen. Außerdem brachte

ich noch am Rande eine Längsreihe Löcher an, um „Reflexion“ des Diffusionsstroms zu vermeiden. Fig. 23 zeigt die Anordnung im Grundriß. Auf die eine Seite kam dann ein Agar ohne, auf die andere Seite ein Agar mit dem Chemotropikum bis zur Höhe der Glimmerplatte. Dann legte ich auf die Platte eine Zelloidinmembran mit einer gleichmäßig dünnen (ca. 0,6 mm) Agarschicht. Fig. 24 gibt einen Querschnitt. Es diffundierte dann, wie ein Versuch mit Eosin zeigte, aus dem Kasten *A* das Chemotropikum durch die Löcher nach oben in die Agarschicht. Da die Löcher sehr eng beieinander liegen, schreitet die Diffusion fast geradlinig über die lochfreie Gasse und durch die Löcher der anderen Seite nach unten in den Kasten *B* fort. Es besteht so zwischen den Lochreihen beiderseits des Mittelstreifens ein lange Zeit konstantes Diffusionsgefälle, in dem der Pilz wuchs.

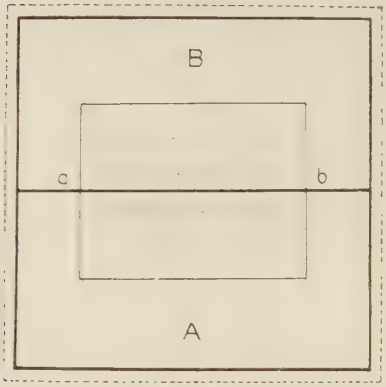

Fig. 23.

Fig. 24.

Die Hyphe, die nach dem Auswachsen in der Mittellinie dieser Gasse wächst, könnte, falls nur negativ-chemotropische Reaktion auf Stoffwechselprodukte stattfindet, nicht chemotropisch reagieren, da diese Stoffe nach beiden Seiten in gleicher Weise abdiffundieren (gleichmäßiges Myzelwachstum vorausgesetzt). Sie wird gleichfalls nicht hydrotropisch reagieren können. Diese Reize sind ja symmetrisch zur Mitte der Gasse angeordnet. Die Hyphen beiderseits der Mitte müßten symmetrisch von ihr zu den Löchern an der Seite abgelenkt sein, entweder negativ-chemotropisch, entsprechend dem Abfall der Stoffwechselproduktkonzentration, oder positiv-hydrotropisch (Fulton, 1906).

Einseitig wirkt nur der Diffusionsstrom von *A* nach *B*. Ist chemotropische oder osmotropische Reaktionsfähigkeit auf das Außenmedium vorhanden, so darf die Anordnung der Hyphen beiderseits der Mitte nicht mehr symmetrisch sein. Wenden sich die Hyphen von *B* nach *A*, so liegt positiver, im umgekehrten Fall negativer

Chemotropismus vor. Mit dieser Anordnung wurden zuerst verschiedene Salze geprüft, die in der folgenden Tabelle angegeben sind. Der Agar enthielt 2 % Malz mit bezw. ohne Salzzusatz. Die Art des Zusatzes enthält Spalte 1; in Spalte 2 sind die chemotropischen Reaktionen angegeben; Spalte 3 zeigt die Anisotrophie. Die Zahlen geben die Myzelradien in Millimeter an den Seiten *A* und *B* an. Die Versuchsdauer betrug bei Impfung mit Myzel 24 Stunden, bei Impfung mit Keimmyzel 36 Stunden, was in Spalte 4 vermerkt ist. 0 ist Indifferenz, + positive, — negative Reaktion; a und b sind die beiden Seiten von der Myzelmitte aus.

Tabelle 17.

1/20 n Na_2SO_4	++	+ 10 : 7,5	36
1/20 n „	a 0 b +	+	36
1/20 n „	— —	+ 11 : 9	24
1/50 n Na_2SO_4	+	— 7 : 11	36
1/50 n „	0 → +	—	36
1/20 n NaCl	a + b —	+ 11 : 9	24
1/20 n „	—	+	24
1/20 n $NaNO_3$	a — b 0	+ 8 : 6	24
1/20 n „	—	+	24
1/20 n „	0 → —	+ 10 : 8,5	24
1/20 n NaCNS	0 → —	+ 10 : 8,5	24
1/20 n „	0 → +	+	24
1/20 n NaH_2PO_4	0	— 9 : 11	24
1/20 n „	0 → +	0	24
1/20 n $(NH_4)_2HPO_4$ . . .	0 → +	0 → + 9 : 8	36
1/20 n „ . . .	0	+ 6 : 4	36
1/20 n „ . . .	0 → +	+ 9 : 6	36
1/20 n KH_2PO_4	0 → +	+	36
1/20 n „	0 → —	+	36
1/20 n „	—	+ 9 : 5	36
1/20 n KNO_3	0 → +	+	24
1/20 n „	—	+	24
1/50 n „	—		24
1/10 n „	—	+	24
1/10 n „	—	+	24
1/20 n $MgSO_4$	++	+	36
1/50 n $Ca(NO_3)_2$	+	+	24

Die Resultate betr. die tropistische Reaktion sind nicht einheitlich. Die Myzelien sind sehr ungleichmäßig gewachsen. Fast stets ist eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit und Dichte auf der Salzseite vorhanden, auch wenn diese Salze keine Nährstoffe sind. Es wäre möglich, daß hierfür Salzspeicherung (Tröndle, 1918) und damit Turgorsteigerung (Eschenhagen, 1898) durch Vergrößerung der Differenz zwischen osmotischem Wert des Zellsaftes und des Mediums verantwortlich zu machen sind. Auf 10 % Malz wurde gleichfalls stark anisotroph reagiert. Schlüsse über den Chemotropismus zu ziehen, ist aus dem Versuch unmöglich. Es sei hervorgehoben, daß positive Anisotrophie und negativer Tropismus keineswegs parallel gehen.

Ich hatte außerdem mit einem Ascomyceten — anscheinend eine *Sordaria* — einige Versuche angestellt; der Pilz zeigte aber spiraliges Wachstum, weswegen sich auch *Mucor hiemalis* und *M. spinosus* zu den Versuchen als ungeeignet erwiesen (Boas, Schmucker). Die Spirotrophie ist auf der Salzseite am auffälligsten. Der Pilz ist beim Betrachten von oben rechts gewunden. Man muß diese Spiraltendenz vorläufig als einen endonomen Vorgang auffassen (Pringsheim, Liesegang, Schmucker). Bei *Phycomyces Blakesleeanus* habe ich sie nie beobachtet.

Um das ungleichmäßige Wachstum durch die Anisotrophie auszuschalten, wurden daraufhin Salze gegeneinander geprüft. In Tabelle 18 sind in Spalte 1 und 2 die Salze auf den verschiedenen Seiten angegeben, Spalte 3 enthält die tropistische Reaktion; die Anisotrophie tritt kaum hervor. Spalte 4 enthält die Versuchszeit.

Tabelle 18.

A	*B*	*A* *B*	
1/20 n KNO_3	1/20 n $Ca(NO_3)_2$	zu *A* 0 → +, zu *B* 0 → —	36
1/20 n „	1/20 n „	„ „ — —, „ „ + +	24
1/20 n KNO_3	1/20 n $NaNO_3$	zu *A* —, zu *B* +	36
1/20 n $Ca(NO_3)_2$	1/20 n $NaNO_3$	zu *A* —, zu *B* +	36
1/20 n „	1/20 n „	„ „ 0, „ „ 0	24

Das Myzel wuchs in dem lochfreien Streifen wesentlich schlechter als über den Löchern. Das Resultat ist somit nicht ganz einwandfrei. Andere Konzentrationen (1/50 n) ergeben nichts anderes.

Die Versuche sprechen keinesfalls gegen einen Chemotropismus gegenüber dem Außenmedium. Etwas Beweisendes sagen sie wieder nicht aus. Das gilt auch für eine Versuchsreihe mit roher und gekochter gebrauchter Nährlösung.

4. Zu weiteren Versuchen ließ ich mir Glaskammern blasen, die an der einen weniger hohen Seite so angeschliffen waren, daß

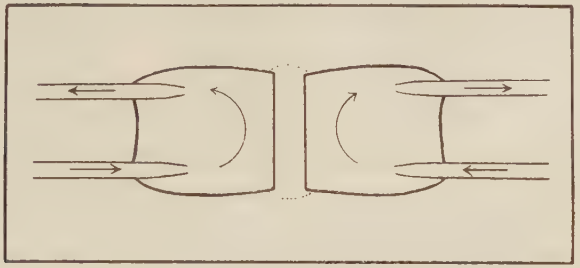

Fig. 25.

ein ca. 1 mm hoher, 2 cm breiter Spalt entstand; in die höhere Rückseite waren zwei Glasröhrchen eingeschmolzen. Ein Paar solcher Diffusionskammern wurde im Abstand von 4 mm so einander gegenüber angeordnet, daß ihre Rückenkanten durch ein dazwischen gekittetes Glasstück auf einer planen Glasscheibe befestigt waren. Fig. 25 zeigt die Anordnung im Grundriß, Fig. 26 im Querschnitt. In den Raum zwischen die Diffusionskammern kam flüssiger Agar (1,5 %), der die Spalten nach dem Erstarren vollständig verschloß. Durch die eine Kammer leitete ich Nähr-

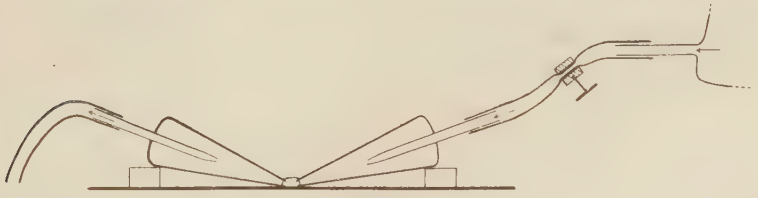

Fig. 26.

lösung, durch die andere steriles Wasser aus Erlenmeyerkolben (1 l) mit Abflußrohr (Geschwindigkeit: 2—4 Tropfen pro Minute). Auf den Agar impfte ich in einigen Versuchen ausgestochenes Myzel; in anderen Fällen kamen, nachdem durch erstarrten Agar schon die Spalten verschlossen waren, noch einige Tropfen eines bei 40° mit Sporen vermischten Agars darauf. Es wurden nur submerse

Hyphen in Betracht gezogen. Beim Durchleiten von 10 % und 5 % Malz wurden weder bei Myzelhyphen noch bei Sporen (je zwei Versuche) einwandfreie Resultate beobachtet. Zukrümmungen waren stets vorhanden, so daß auch diese Ergebnisse nicht gegen einen positiven Chemotropismus angeführt werden können. Die Hyphen reagierten stark positiv anisotroph.

Ebenso verliefen Versuche, bei denen verschiedene Substanzen in fester Form an den Rand eines wachsenden Myzels gebracht waren, ohne beweisendes Ergebnis.

Nach der oben beschriebenen Versuchsanordnung wurden auch Versuche mit gebrauchter Nährlösung durchgeführt. In Erlenmeyerkolben (1 l) mit 600 ccm 2-, 3-, 5proz. Malzlösung impfte ich Sporen von *Phycomyces Blakesleeanus*. Während des Versuchs wurde Luft durch die Flüssigkeit geleitet, damit intensives Wachstum ohne O_2-Mangel stattfände. Nach ca. 8 Tagen hatte sich eine Substrathaut gebildet und die Fruktifikation begonnen. Die Nährlösung wurde alsdann durch die eine Kammer geleitet, durch die andere steriles Wasser bezw. 1proz. Malzlösung. Der Agar enthielt 1 % Malz. Es wurden Sporen verwandt. In vier Versuchen konnte keine Ablenkung der Keimmyzelien festgestellt werden. Krümmungen der Hyphen waren häufig, eine Richtung wurde jedoch nicht bevorzugt.

Aus allen diesen Versuchen geht kein Beweis weder für noch gegen einen Chemotropismus auf von außen herandiffundierende Stoffe hervor, aber auch keiner für einen negativen Chemotropismus auf eigene Stoffwechselprodukte. Ich versuchte daher auf anderem Wege etwas über die Natur der vorhandenen chemotropischen Krümmungen zu erfahren.

5. Knäuelbildung und ihre Ursachen.

In den Versuchen, in denen durch Löcher in einer mit Zelloidinmembranen bedeckten Glimmerplatte ein Chemotropikum zum Myzel heraufdiffundierte, fiel bei sämtlichen verwandten Pilzen die Bildung eines Hyphenknäuels auf. Wenn die Löcher durch Chemotropismus oder Anisotrophie erreicht worden waren, bildete sich durch reichliche Verzweigung zuerst ein Hyphengeflecht, das allmählich durch besonders starkes Wachstum an der der Membran zugewandten Seite in die Höhe gehoben wurde und die Gestalt eines Buckels oder Türmchens annahm. Befand sich auf der Membran

eine Agarschicht, so wurde diese über der Stelle zuerst aufgewölbt und dann durchbrochen, wenn nicht vorher, was häufiger war, das Türmchen durch die Oberflächenspannung des Agars zum Ausrutschen gebracht wurde (Fig. 27, mit Nadeln umgelegt). Auf Spalten in der Glimmerplatte bildete sich ganz entsprechend ein kammartiger Wall.

Es schien leicht möglich, die Bedingungen für diese Bildungen zu ermitteln; das erschien interessant, weil sich dabei vielleicht ein Anhaltspunkt zur Deutung der Zukrümmungen ergeben konnte. Am nächsten lag es, die Knäuel auf die gleichen Ursachen zurückzuführen, auf denen das Auswachsen im Myzel und die Wallbildung durch Anisotrophie vor aufgesetzten Agarblöcken beruht, d. h.

Fig. 27.
Hyphenknäuel auf einem Loch (rechts) über 3 % Malz, links Zwergsporangien.

also auf Nährstoffzufuhr. Dafür sprach ja auch die Tatsache, daß mit steigender Ernährung die Buckel größer werden und schneller entstehen.

Es lagen aber einige Versuche vor, die zeigten, daß die Ernährung vielleicht nur als selbstverständliche Voraussetzung allen Wachstums an der Knäuelbildung und dem Grade ihrer Ausbildung beteiligt war. Über Regenwasseragar und fernerhin über destilliertem Wasser fand nämlich auf den Löchern, wenn auch wegen der schlechten Ernährung sehr langsam und kümmerlich, unverkennbar die Bildung eines Buckels bezw. eines Hyphengeflechts statt. Ebenso fanden sich Zukrümmungen, die aber wie die schwache Buckelbildung erst einige Zeit nach Überwachsen der Löcher durch langsam auswachsende Hyphen veranlaßt werden.

Diese Tatsache erinnert an die Versuche Clarks, der gleichfalls Zukrümmungen auf reines Wasser erhielt und daraus auf negativen Chemotropismus auf eigene Stoffwechselprodukte schloß.

Ich machte eine Anzahl Versuche zur Klärung. Auf Glimmerplatten mit zwei Kreisen von 4 und 6 Löchern (Abstand 5 mm) wurde eine Membran gelegt mit einer ca. 0,6 mm hohen Agarschicht (1,5 % Agar, 2 % Malz). In den Mittelpunkt der Kreise impfte ich Myzel von *Phycomyces Blakesleeanus*. Die Platten lagen in Petrischalen entweder auf Agar oder bei Verwendung von Lösungen auf zwei Glasstreifen. Ich nahm Membranen verschiedener Durchlässigkeit, und zwar aus Zelloidin, Kollodium (Dialyse) und Schweinsblase.

Bei der Verwendung von Zelloidin- und Kollodiummembranen ergab sich in keinem Fall ein Unterschied. Das spricht bereits dafür, daß die Abdiffusion von komplizierter gebauten Hemmungsstoffen (Lutz, 1909) nicht für die Knäuelbildungen verantwortlich zu machen ist. Auf Malzböden zeigte sich nach ca. 24 Stunden die typische Buckelbildung mit Zukrümmungen sofort nach Überwachsen der Löcher. Auf Böden von der Zusammensetzung

1,5 % Glukose,	0,4 % NH_4NO_3,
0,4 „ $(NH_4)_2HPO_4$,	0,2 „ KH_2PO_4,
0,2 % $MgSO_4$	

war das gleiche der Fall. Es ergab sich aber eine auffallende Verschiedenheit in der Form der Buckel, die hier flacher und breiter waren. Dieses Auswachsen in weiterer Entfernung vom Loch erscheint mir nur auf Grund der höheren Diffusionsgeschwindigkeit der molekulardispersen Nährstoffe deutbar; dafür spricht auch, daß über der Schweinsblase nur auf dem Glukoseboden und bei höheren Malzkonzentrationen ein schwacher Beginn nach längerer Zeit erkennbar war. Da die Schweinsblase aber für Rohrzucker fast nicht, für Eosin nicht durchlässig ist, kann eine Abdiffusion von irgendwie komplizierter gebauten Stoffwechselprodukten keinesfalls stattgefunden haben. Es liegt hier nur eine Heraufdiffusion von molekulardisperser Nahrung vor. Gegen die Annahme einer Wasserbewegung spricht die Tatsache, daß über sterilem Wasser bei Verwendung einer Schweinsblase niemals eine Buckelbildung angedeutet ist. Daraus läßt sich eine Deutung der Buckelbildung über destilliertem Wasser bei leichter durchlässigen Membranen ableiten. Es könnte hier vor dem Überwachsen eine Abdiffusion

von Nährstoffen in das Wasser stattfinden, so daß dann nach dem Verbrauch der absolut ja geringen Nährstoffmenge in der oberen Agarschicht eine Nährstoffdiffusion in geringem Ausmaß von unten her aus dem „destilliertem Wasser" stattfindet. Bei der Schweinsblase findet eine solche Abdiffusion nicht statt. Entscheidend ist der folgende Versuch:

An zwei gegenüberliegenden Ecken setzte ich in die Wandung eines quadratischen Glaskastens (76 mm) Glasröhrchen ein. In die Kammern legte ich die Glimmerplatte mit der Membran auf zwei Glasstreifen (Fig. 28). In die dünne Agarschicht kam 5 % Malz. Sofort, nachdem das Myzel auszuwachsen begann, wurde aus einem Erlenmeyerkolben mit Abflußrohr steriles Aqua dest. durchgeleitet. Das Myzel wuchs gut, nahm aber allmählich an Dichte ab, da durch Abdiffusion die Nährstoffmenge geringer wurde. Es konnten weder Zukrümmungen noch der Beginn einer Buckelbildung beobachtet werden. Dadurch verliert der Schluß Clarks, daß negativer Chemotropismus vorhanden sei, die Unterlagen.

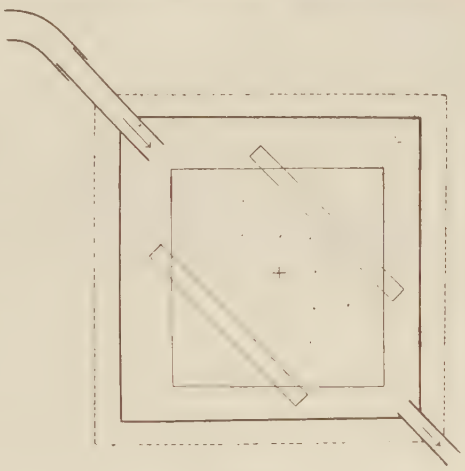

Fig. 28.

Das Auswachsen und die Knäuelbildung ist nach diesem Versuch ausreichend nur durch Nährstoffzufuhr zu erklären.

6. Allgemeine und ökologische Bemerkungen.

Das Ergebnis der letzten Versuche, daß nämlich die Knäuelbildungen auf Nährstoffzufuhr zurückzuführen sind, läßt die Zukrümmungen als positiv-chemotropisch vermuten. Die Tatsache aber, daß über destilliertem Wasser nicht sofort beim Überwachsen, sondern erst später Zukrümmungen auftreten, daß diese beim Durchleiten von Wasser niemals zu beobachten sind, schließt mit größter Wahrscheinlichkeit das Bestehen eines negativen Chemotropismus auf eigene Stoffwechselprodukte aus. Aus dem Fehlen hinreichend eindeutiger positiv-chemotropischer Reaktionen in den Diffusions-

versuchen geht dagegen deren Nichtvorhandensein wegen der störenden und verdeckenden Anisotrophie nicht sicher hervor. Es sei im Zusammenhang damit bemerkt, daß auf Böden mit hohem Nährstoffgehalt die Bildung der Substrathaut und die Verfilzung durch übereinander weg wachsende Hyphen zustande kommt, die chemotropische Einlenkung der Tochterhyphen also undeutlicher wird.

Es sind bei Myzelhyphen chemotropische Krümmungen einwandfrei vorhanden. Bewiesen ist in keinem Fall ihre negative oder positive Natur. Einleuchtender und wahrscheinlicher als ein negativer Chemotropismus auf besondere Stoffwechselprodukte, deren Existenz fraglich ist, erscheint mir die Fähigkeit zu chemotropischer Reaktion auf von außen herandiffundierende Stoffe. Daß tropistische Reaktionen bei Pilzhyphen kaum zu erzwingen sind, erscheint bei dem geringen Durchmesser verständlich. Es ist im Experiment sehr schwer, ein hinreichend großes Konzentrationsgefälle auf den beiden Flanken der wachsenden Hyphenzone herzustellen und hinreichend lange zu erhalten.

Am besten verwirklicht sind diese Bedingungen bei der Ablenkung im Hemmungsraum. Auf der einen Seite grenzt an die Hyphenspitze, die gerade die Hemmungslinie erreicht, unbewachsener Agar an, auf der anderen Seite ist das Substrat an einem Stoff völlig verarmt. Die Zudiffusion dauert am längsten bei spitzen Winkeln des Aufeinandertreffens — die meisten Krümmungen —; sie ist am kürzesten bei stumpfen Winkeln — Wachstumseinstellung aus Nahrungsmangel vor der Krümmung. Da die Konzentrationsdifferenz nur an der Hyphenspitze besteht, ist Gelegenheit zu einer Reaktion durch Anisotrophie nicht gegeben. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse beim Einkrümmen der Tochterhyphen in die radiäre Richtung auf dünnen Schichten.

Verhältnismäßig häufig sind die Zukrümmungen auch zu Löchern in Glimmerplatten. Wir haben das am meisten punktförmige Diffusionszentrum mit starkem Konzentrationsgefälle. Hier tritt die Anisotrophie aber schon störend hervor.

Bei Wurzelhaaren, für die bei gleichfalls geringem Durchmesser die Dinge ähnlich liegen, fällt die störende Anisotrophie fort. Wie schwer es auch dort ist, Krümmungen zu bekommen, obwohl die Fähigkeit dazu einwandfrei vorhanden ist, zeigt Seidel (1924).

Man müßte, um den Chemotropismus bei Pilzen genau studieren zu können, die Anisotrophie verhindern und an beiden Seiten der

Hyphenspitze einen starken Konzentrationsunterschied erhalten können, was in den bisherigen Versuchen nicht gelungen ist.

Aus dem Gesagten geht schon hervor, daß der Chemotropismus bei den Phycomyceten für das Erreichen optimaler Ernährungsbedingungen bedeutungslos ist, wie auch Müller angibt. Durch einseitige Förderung von Seitenorganen — Anisotrophie — reagiert der Pilz auf alle herandiffundierenden Stoffe, die sein Wachstum beschleunigen. Das kann einerseits durch Substanzen geschehen, die entweder selbst direkt ernährend wirken, oder indirekt durch Permeabilitätserhöhung, andererseits durch Reizstoffe (wie z. B. Schwermetalle in geringen Mengen: Raulin, Richter, Reese, Pringsheim) und schließlich durch nicht ernährende Salze, die, vielleicht durch Erhöhung des Turgors, die Wachstumsgeschwindigkeit erhöhen.

Abschnitt VI.

Membranquellung und Membranchemie.

Zum Schluß seien kurz die Ergebnisse von Quellungsversuchen angeführt, die an pilzlichen Membranen unternommen wurden, um Daten über die physikalisch-chemische Einwirkung verschiedener Stoffe zu erhalten. Zur Quellung erwiesen sich Sporen als ungeeignet, da sie beim Behandeln mit verschiedenen Lösungen keine Änderung ihres Durchmessers zeigten. Die Sporenmembran selbst änderte sich allerdings, war aber wie auch die der Hyphen zu dünn für Messungen. Als brauchbar erwiesen sich die Membranen der *Sikyo*-Sporen, die nach Burgeff (1924) *Parasitella* auf *Rhizopus niger* bildet. Beide Pilze wurden auf eine Platte geimpft und diese nach gutem Ausreifen (ca. 3 Wochen) mit 30 % Alkohol übergossen. Es geschah das zur Abtötung und besseren Benetzbarkeit der Blasen. Auf die Quellung — durch irreversible Vorgänge oder Hysterese — hat diese Vorbehandlung nach Auswaschen in Aqua dest. (24 Stunden) keinen Einfluß mehr, wie zahlreiche Kontrollversuche mit frischen *Sikyo*-Sporen bewiesen. Gemessen wurde mit Okularmikrometer und Ok. 4 Obj. 7 Winkel. Die Membran hatte einen Durchmesser von ca. 2 μ. Dieser Wert wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen auf ihn bezogen. Es wurde eine große Anzahl *Sikyo*-Sporen 24 Stunden in Aqua dest. ausgewaschen und dann in die betreffenden Lösungen übertragen. Nach 24 Stunden wurden sie zusammen mit der Kontrolle gemessen. Es kamen

durchschnittlich je 30—40 Membranen zur Messung, in einigen Fällen nur 20, in unsicheren bis 60. Das Resultat für molare Lösungen zeigt das Kurvenbild Fig. 29.

In KCl konnte bei einer geringeren Zahl von Messungen eine Einwirkung nicht festgestellt werden. Eine n-Oxalsäure wirkt schwach quellend (1,2), in $^1/_2$ n konnte keine Einwirkung mehr beobachtet werden. Alkohol wirkt entquellend. Das Verhältnis von Membranen in aqua dest. zu 30 % zu 70 % Alkohol ist wie

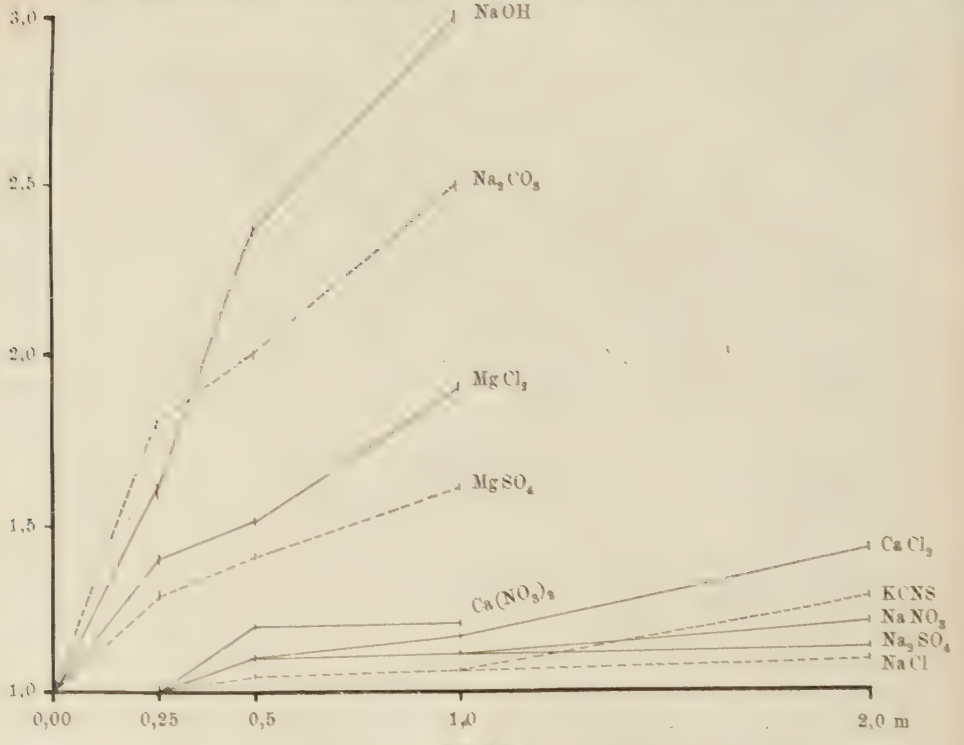

Fig. 29.

1 : 0,8 : 0,6. Chloralhydrat wirkt quellend (10 % = 1,4). Die Quellungen sind, soweit untersucht, reversible: Membranen aus n-NaOH zeigten den Durchmesser 3. nach 24stündigem Auswaschen 1.4. Etwas Hysterese ist also noch vorhanden. In H_2SO_4 höherer Konzentration findet nach starker Quellung Lösung und Zersetzung statt. Die Versuche wurden dann abgebrochen.

Die Reihenfolge der Ionen ist nicht die gewöhnlich bei Quellungen beobachtete. Das könnte zum Teil in dem komplizierten

Aufbau der *Sikyo*-Sporenmembran bedingt sein, der anschließend daran untersucht wurde (s. auch Burgeff, 1924).

Die Chitin-Reaktion ist nach Wisselingh (1915) ausgeführt. Es ergab sich, daß zum einfachen Nachweis von Chitosan einstündiges Erhitzen in Reagenzgläsern mit 60 % KOH im Autoklaven bei 1 Atmosphäre Druck gute Resultate gibt (s. auch Vouk, 1915). Die folgenden Angaben stammen jedoch aus Reaktionen nach der Wisselinghschen Methode: Abbau von Chitin zu Chitosan mit 50—60 % KOH in zugeschmolzenen Glasröhren bei 160° im Ölbad. Als Vergleichsobjekt dienten Flügel einer Florfliege *(Chrysopa)*. Die Zygoten der *Parasitella* wurden gleichzeitig mit untersucht.

Die Reaktion mit Chlorzinkjod und JKJ (Violettwerden beim Auswaschen) und die positive Chitosanreaktion mit JKJ und 3 % H_2SO_4 zeigten für die Membran der vegetativen Hyphen, die Zygotenmembran (assise cartilagineuse Vuillemin) und die Innenschichten der *Sikyo*-Sporen Chitin an. Die Färbung ist bei der Zygotenmembran am reinsten, am schwächsten bei den *Sikyo*-Sporen; bei denen ist die Reaktion in der innersten der drei Schichten am stärksten. In der äußersten Schicht ist Chitin nur ganz schwach am inneren Rand angedeutet. Die Warzen der Zygote (assise charboneuse Vuillemin) sind chitinfrei und bleiben hellgelb; sie lösen sich nicht in konz. H_2SO_4, wohl aber in Chromschwefelsäure, in der sich alle Objekte lösen, außer einer Schicht der Zygotenmembran (la cuticelle médiane), die mit scharfen Konturen erhalten bleibt. Der Lösung in konz. H_2SO_4 geht bei den *Sikyo*-Sporen starke Quellung voraus. Der Inhalt färbt sich auffallend rosa, was vielleicht als Reaktion auf Lipoide aufzufassen ist (Liebermannsche Reaktion). Nach längerer Einwirkung tritt unter Braunfärbung Zerfall ein. Die dünne innerste Membranschicht widersteht der Schwefelsäure sehr lange. In JKJ und 72 % H_2SO_4 gehen die Objekte nach anfänglicher Jodfärbung durch schmutzig Rotviolett (Chitin) in teilweise Lösung über.

Die innerste, stark gequollene Schicht der *Sikyo*-Sporenmembran nimmt dabei tiefblaue Färbung an, die beim Auswaschen verschwindet und dann durch ein schmutziges Rotviolett (Chitin) ersetzt wird. Echte Zellulose liegt dabei nicht vor, da die Reaktion nach Erhitzen der Objekte in Glyzerin bei 300° C (Wisselingh) und nach dem Chitosanaufschluß nicht mehr auftritt. Man wird also eine Hemizellulose annehmen müssen. Es ist auffallend, daß die gleiche Schicht am stärksten chitinhaltig ist.

Rutheniumrot gibt karminrote Färbung der *Sikyo*-sporen und -hyphen. Die Zygotenmembran ist ungefärbt, die Warzen tiefrot. Diese werden mit Safranin kirschrot, *Sikyo*-sporen und -hyphen orange bis braungelb, die Zygotenmembran bleibt wieder ungefärbt. Die Membranteile, die weder Chitinreaktion noch Blaufärbung mit Zellulosereagentien zeigen, aber Farbstoffe speichern, müßten demnach aus pektinartigen Substanzen bestehen. Daß diese auf Adsorption beruhenden Farbstoffreaktionen nur recht begrenzten Wert haben, wird dadurch gezeigt, daß der *Chrysopa*-Flügel nach Vorbehandlung mit KOH die gleiche Färbbarkeit besaß. Diese Reaktionen sind im wesentlichen nur vom physikalisch-chemischen Zustande der Substanzen abhängig.

Die Membranen der *Sikyo*-Sporen sind also keineswegs einfach gebaut, so daß die Quellungsverhältnisse hierdurch kompliziert sein können. Ich glaube aber doch, daß die Befunde auf gewöhnliche Pilzmembranen übertragbar sind. Die quellende Substanz ist auch am Aufbau der Hyphen beteiligt und scheint der Rutheniumrot-speichernde Stoff zu sein. In Alkalien quillt die Hyphenmembran jedenfalls auch so stark, daß dies mikroskopisch gut erkennbar ist. Schmiedeberg (1920) führt die Quellbarkeit der Pilzmembranen auf die Pektinstoffe zurück (s. auch Grafe, 1911).

Abschnitt VII.

Zusammenfassung.

1. Bei Erhöhung der Nährstoffmenge nimmt die Verzweigung und der Hyphendurchmesser zu. Gleichfalls steigt die Wachstumsgeschwindigkeit bis zu einer bestimmten optimalen Konzentration an, um dann langsam abzufallen. Das Verhältnis von Lang- zu Seitenhyphen ist dabei nicht konstant, sondern nimmt bei besserer Ernährung zu. Dabei ist es innerhalb gewisser Grenzen gleich, ob man die Nährstoffmenge durch Veränderung der Konzentration oder der Schichtdicke heraufsetzt. Die Myzelausbildung ist von der absoluten Nährstoffmenge abhängig.

2. Eine radiäre Einstellung der Hyphen durch chemotropische Einkrümmung kann bei sehr großer Substrathöhe nicht mehr erfolgen. Sie kommt dann dadurch zustande, daß — bei gleichem Abzweigwinkel — die Haupthyphe und die Tochterhyphe zweiter Ordnung von vornherein parallel gerichtet sind. Die Tochterhyphen

erster Ordnung, die sich auf dünnen Schichten radiär einstellen, führen hier eine Verflechtung herbei.

3. Bei schlechter Ernährung und entsprechend geringem Stoffumsatz kann der Pilz seinen O_2-Bedarf vollständig aus dem Substrat decken, dessen Querschnitt er gleichmäßig durchzieht. Bei besserer Ernährung wachsen die Hyphen mehr und mehr an der Oberfläche.

4. Die Myzelhyphen besitzen die Fähigkeit, positiv aërotropisch zu reagieren. Die häufigste Form der Reaktion ist die Anisotrophie, das ist die Wachstumsförderung entsprechend gerichteter Organe.

5. Zwei aufeinander zuwachsende Myzelien bilden auch bei den Mucorineen auf Malzböden Hemmungsräume aus. Die Ursache ist nicht in besonderen Hemmungsstoffen, sondern in Stickstoffmangel zu suchen. Mit steigender Nährstoffmenge nimmt die Hemmungsraumbreite ab. Die Bildung eines Hemmungsraumes ist auch ohne zweites Myzel möglich. Nach Zugabe fester Stickstoffnahrung wächst der Hemmungsraum zu. Ein Hemmungsraum läßt sich auch durch Kohlenstoffmangel herbeiführen.

6. Herabsetzung der Diffusionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Agarkonzentration, die die Wachstumsgeschwindigkeit wenig beeinflußt, führt zu einer Verschmälerung des Hemmungsraumes. Erniedrigung der Temperatur führt bei starker Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit zu einer Verbreiterung. Auf der alkalischen Seite nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit ab und die Hemmungsraumbreite zu. Auf der sauren Seite ist eine Änderung nicht erheblich. Das Maximum der Ausbreitungsgeschwindigkeit liegt auf der sauren Seite.

7. Eine Hemmungsraumbildung durch Ansäuerung tritt bei dem säureempfindlichen *Mucor Bedrchani* ein. Die Hemmungsraumbreite nimmt wie die Ionenazidität mit steigender Nährstoffkonzentration zu. Alkalische Reaktion des Substrats hebt die Hemmung auf. Die Hemmungsraumbildung ist keine einheitliche Erscheinung. Die Annahme besonderer Stoffwechselprodukte ist auch hier zur Deutung nicht nötig.

8. Verschiedene Arten können sich gegenseitig hemmen oder ineinander einwachsen. Es ist durch Änderung der Ernährung möglich, in einer Kombination aus dem überwachsenen Pilz den überwachsenden zu machen.

9. Über Auswachsen und Nichtauswachsen im Myzel wird in gleicher Weise durch die Ernährungsverhältnisse entschieden. Die

Annahme von fördernden oder hemmenden Stoffwechselprodukten erwies sich als nicht erforderlich.

10. Chemotropismus kommt sicher vor, ob positiver oder negativer Natur konnte nicht sichergestellt werden. Positiver Chemotropismus auf Nährstoffe ist anscheinend vorhanden. Darauf ist wahrscheinlich auch die gegenseitige Ablenkung der Hyphen zurückzuführen. Die normale Reaktionsform auf Diffusionszentren ist die Anisotrophie, die ökologisch den Chemotropismus ersetzt.

Die Untersuchungen wurden im Pflanzenphysiologischen Institut zu Göttingen auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. Burgeff ausgeführt. — Ich möchte meinem hochverehrten Lehrer für die vielen Anregungen und für das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, meinen ganz besonderen Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis.

Benecke, W., Die zur Ernährung der Schimmelpilze notwendigen Metalle. Jahrb. f. wiss. Bot., 28, 1895.

Benecke-Jost, Pflanzenphysiologie. Jena 1924.

Boas, Fr., Über Pilzkolonien mit spiraligem Wachstum. Zentralbl. f. Bakt., I, 49, 412, 1919.

— —, Selbstvergiftung bei *Aspergillus niger*. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 37, 63, 1919.

Boyle, C., Studies in the physiology of parasitism. II. Ann. of Bot., 38, 1924.

Bresslau, E., Ein einfacher, insbesondere für kleine Flüssigkeitsmengen geeigneter Apparat usw. Deutsch. med. Wochenschr., 1924, Heft 6.

Brunswig, H., Unters. über die Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomycetengattung *Coprinus*. Bot. Abhandl., 5. Jena 1924.

Burgeff, H., Unters. über Variabilität, Sexualität und Erblichkeit bei *Phycomyces nitens* Kunze. I u. II. Flora, 107 u. 108, 1915.

— —, Unters. über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. Bot. Abhandl., 4. Jena 1924.

— —, Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces*. Flora 1925. Goebelband 40.

Butkewitsch, Jahrb. f. wiss. Bot., 38, 1903.

Clark, J. E., On the toxic properties of some copper compounds usw. Bot. Gaz., 33, 45, 1902.

De Bary, A., Über einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten. Bot. Ztg., 1886, 416 ff.

Eschenhagen, Fr., Über den Einfluß von Lösungen verschiedener Konzentrationen auf das Wachstum von Schimmelpilzen. Diss. Leipzig 1889.

Exner, F., 1875, zitiert nach Benecke-Jost, 1924.

Falk, R., Die Bedingungen und die Bedeutung der Zygotenbildung bei *Sporodinia gr.* Beitr. z. Biol. d. Pflanzen (Cohn), 8, 1902.

Fulton, H. R., Chemotropism of *Fungi*. Bot. Gaz., 41, 1906.

Grafe, V., In Abderhalden, Biochem. Handlexikon, II, 80, 1911.
Graves, A. H., Chemotropism in *Rhizopus*. Bot. Gaz., 62, 1916.
Günther, E., Beitrag zur mineralischen Nahrung der Pilze. Diss. Erlangen 1897.
Hagem, O., Unters. über norweg. Mucorineen. II. Kristiania 1910.
Harder, R., Über das Verhalten von Basidiomyceten und Ascomyceten in Mischkulturen. Diss. Kiel 1911.
Höber, R., Physik. Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig 1922.
König, J., Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel, II, 392, 1883.
Küster, E., Keimung und Entwicklung von Schimmelpilzen in gebrauchten Nährlösungen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 26a, 1908.
— —, Über chemische Beeinflussung der Organismen durcheinander. Roux' Vorträge über Entwicklungsmechanik. Leipzig 1909.
La Garde, R., Über Aërotropismus an den Keimschläuchen der Mucorineen. Zentralbl. f. Bakt., II, 31, 1911.
Lendner, A., Les Mucorinées de la Suisse, 1908. Matériaux pour la Flore Cryptogamique Suisse, III, 1.
Liesegang, R., Chemische Reaktionen in Gallerten. Leipzig 1924.
Lutz, O., Über den Einfluß gebrauchter Nährlösung auf Keimung und Entwicklung einiger Schimmelpilze. Ann. Mycolog., 7, 1909.
Mangin, L., Observations sur la membrane des Mucorinées. Journ. de Bot., XIII, 208, 1899.
Michaelis, L., Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.
Miyoshi, M., Über Chemotropismus der Pilze. Bot. Ztg. 1894.
— —, Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. Jahrb. f. wiss. Bot., 28, 1895.
Molisch, H., Mikrochemie der Pflanze. Jena 1913.
Müller, K. O., Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie des Pilzmycels. Beitr. z. Allg. Bot., II, 1922.
Nikitinsky, Über die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, 40.
Pringsheim, E. G., Über den Einfluß der Nährstoffmenge auf die Entwicklung der Pilze. Zeitschr. f. Bot., 6, 1914.
— —, Über Kolonien mit Wachstum in einseitswendigen Spiralen. Centralbl. f. Bakt., II, 48, 1918.
Raulin, J., Etudes chimiques sur la végétation. Ann. sc. nat. Bot., Ser. V, 11, 205, 1869.
Reinhardt, O. M., Das Wachstum der Pilzhyphen. Jahrb. f. wiss. Bot., 23, 1892.
Reese, H., Der Einfluß der gebrauchten Nährlösung, des Zn. und Mn. auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Diss. Kiel 1912.
Richter, A., Zur Frage der chemischen Reizmittel. Centralb. f. Bakt., II, 7, 417, 1901.
Samec, M. und Isajewic, V., Physiko-chem. Analyse der Agargallerte. Colloidchem. Beihefte, 16, 1922.
Schmidt, E. W., Ein Beitrag zur Anwendung des Celloidins in der biol.-experim. Methodik. Zeitschr. f. biol. Technik u. Methodik, 1908.
Schmiedeberg, O., Über Chitin und Chitinabkömmlinge im Tier- und Pflanzenreich. Arch. f. experim. Pathologie u. Pharmakologie, 87, 1920.
Schmucker, Th., Rechts- und Linkstendenz bei Pflanzen. Beih. z. bot. Zentralbl., 41, 1924.
Seidel, K., Untersuchungen über das Wachstum und die Reizbarkeit der Wurzelhaare. Jahrb. f. wiss. Bot., 63, 1924.
Tröndle, A., Arch. d. sciences phys. et nat. Genf 1918.

Trzebinski, M. I., Über den Einfluß verschiedener Reize auf das Wachstum von *Phycomyces nitens*. Anzeiger d. Akad. d. Wiss. Krakau, math.-nat. Kl., 1902.

Tunmann, O., Pflanzenmikrochemie. Berlin 1913.

Ulehla und Moraveck, Über die Wirkung von Säuren und Salzen auf *Basidiobolus ran*. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 40, 1922.

Voigtländer, K., 1889, zitiert nach Liesegang, 1924.

Vouk, V., Zur Kenntnis der mikrochemischen Chitinreaktion. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 33, 1915.

Vuillemin, 1903, zitiert nach Lendner, 1908.

Walter, H., Protoplasma und Membranquellung bei Plasmolyse. Jahrb. f. wiss. Bot., 62, 1923.

— —, Plasmaquellung und Wachstum. Zeitschr. f. Bot., 16, 1924.

Wehmer, C., Über Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Ztg., 1891.

— —, Selbstvergiftung in *Penicillium*-Kulturen usw. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 31, 210, 1913.

Wester, D. H., Studien über das Chitin. Arch. d. Pharm., CCXLVII, 1909.

— —, Zeitschr. f. Bot., 2, 510, 1910.

Wettstein, Fr. v., Das Vorkommen von Chitin und seine Verwertung als systematisch-phylogenetisches Merkmal im Pflanzenreich. Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. zu Wien, math.-nat. Kl., 130, 1, 1921.

Wisselingh, C. v., Mikroskopische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi. Jahrb. f. wiss. Bot., 31, 1897.

— —, Über die Anwendung der in der org. Chem. gebräuchlichen Reaktionen bei phytomikrochemischen Unters. Fol. mikrobiol., III, 1915.

Wortmann, I., Zur Kenntnis der Reizbewegungen. Bot. Ztg., 1887.

Zemplèn, G., In Abderhalden, Biochem. Handlexikon, II, 527, 1911.

Lebenslauf

Ich, Reinold Schmidt, bin 21. November 1901 als Sohn des Rechtsanwalts Albert Schmidt zu Duderstadt in Südhannover geboren. Nachdem ich dort das human. Gymnasium absolviert hatte, begann ich Ostern 1920 in Jena das Studium für das höhere Lehramt. Neben Chemie und Physik hatte ich anfangs Mathematik als Fach, später Biologie und Geologie. Bei meiner Promotion war Botanik Hauptfach, Zoologie und Geologie Nebenfach. Ich studierte je 2 Semester in Jena und Rostock, 1 Semester in Würzburg und vom Herbst 1922 ab in Göttingen. Vorlesungen und Übungen hörte ich in der Botanik bei den Prof. Dr. Burgeff, Berthold, Kniep, Falkenberg und Privatdozent Dr. Krause, in der Zoologie bei den Prof. Dr. Kühn, Schleip, v. Frisch, Winterstein und Privatdozent Dr. v. Ubisch, in der Geologie bei Prof. Dr. Stille, über biologische Kolloidchemie bei Privatdozent Dr. Handovsky.

Der Dissertation und der mündlichen Prüfung wurde das Prädikat „Sehr gut“ zuerteilt.